

**WIRKSAMKEIT UND UNSCHÄDLICHKEIT
EINES NEUEN KOMBINATIONSIMPFSTOFFES
AUS MUCOSAL DISEASE - UND EKTHYMAVIRUS**

GEORG GRAHAMER

1985

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand : Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Wirksamkeit und Unschädlichkeit eines neuen
Kombinationsimpfstoffes aus Mucosal Disease- und Ekthymavirus

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Georg Grahmer
aus Dachau

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. H. Gerlach

Tag der Promolotion: 28. Februar 1986

Meinen Eltern

Dr. Georg und Johanna Grahamer

in Dankbarkeit gewidmet

GLIEDERUNG

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Schrifttum</u>	3
Wesen und Wirksamkeit von Kombinationsvaccinen	
2.1. Kombinationsvaccinen, Begriffsbestimmung, Wesen und Bedeutung	3
2.2. Kombinationsvaccinen aus vermehrungsfähigen Erregern	6
2.3. Kombinationsvaccinen aus inaktivierten Erregern	9
2.3.1. Numerisch-additive Kombinationsvaccinen	9
2.3.2. Funktionell-synergistische Kombinationsvaccinen	11
2.4. Kombinationsvaccinen aus vermehrungsfähigen und inaktivierten Erregern	12
2.5. Interaktionen bei Kombinationsvaccinen	13
2.5.1. Einflüsse, die von den Vaccinenkomponenten ausgehen	13
2.5.2. Einflüsse, die vom Impfling ausgehen	17
2.6. Wirkungen von immunmodulierenden Zusätzen bei Kombinationsvaccinen	18
2.6.1. Adjuvantien	18

2.6.2. Paramunitätsinducer	20
2.7. Allgemeine Vor- und Nachteile der Impfprophylaxe mit Kombinationsvaccinen	22
3. <u>Eigene Untersuchungen</u>	24
3.1. <u>Material und Methoden</u>	24
3.1.1. Impfstoff	24
3.1.2. Tiermaterial	25
3.1.2.1. Kleine Versuchstiere (Maus, Kaninchen)	25
3.1.2.2. Rind (Art der Impfbestände)	25
3.1.3. Prüfung der Unschädlichkeit	32
3.1.3.1. Kleine Versuchstiere	32
3.1.3.2. Rind, Schaf	33
3.1.4. Prüfung der immunisierenden Wirksamkeit	33
3.1.4.1. Mikroneutralisationstest mit BVD/MD-Virus	33
a) Kaninchen	33
b) Rind	33
3.1.4.2. Intracutantest mit Parapoxvirus	34
3.1.5. Nachweis der paraspezifischen Wirkung	35
3.1.5.1. VSV-Infektionsmodell mit Babymäusen	35
3.1.5.2. Aujeszky-Infektionsmodell mit adulten Mäusen	36
3.1.6. Feldversuche	37
3.1.6.1. Impfmodus	37
3.1.6.2. Probenentnahme	37
3.1.6.3. Klinische Beobachtung	37

3.2. <u>Ergebnisse</u>	38
3.2.1. Nachweis der Unschädlichkeit	38
3.2.2. Nachweis der immunisierenden Wirksamkeit	38
3.2.2.1. Kleine Versuchstiere	38
3.2.2.2. Mastkälber im Feldversuch	42
3.2.3. Nachweis der paraspezifischen Wirkung	45
3.2.3.1. VSV-Infektionsmodell	45
3.2.3.2. Aujeszky-Infektionsmodell	50
4. <u>Besprechung der Ergebnisse</u>	52
5. <u>Zusammenfassung</u>	57
Summary	58
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	59
Lebenslauf	73

1. Einleitung

Die bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD) ist eine Virusallgemeinerkrankung, die sich klinisch unterschiedlich manifestiert. Bekannt sind akute, chronische, persistierende, intrauterine und subklinische Verlaufsformen (53).

Die Ausbildung einer Immunität gegen BVD/MD ist auf Grund einer besonderen Affinität des Erregers für das lymphoretikuläre Gewebe mit Unsicherheitsfaktoren belastet. Eine Infektion mit Feldvirus führt zu einer massiven Leukopenie zu Beginn der Virämiephase. Die virusbedingte Immunsuppression äußert sich zudem in einer Nicht-Ansprechbarkeit der Lymphozyten auf mitogene Reize, einer gestörten Antikörperbildung und einer Bildung von Immunkomplexen (20, 29, 67). Bezüglich der erwähnten Schädigungen des Immunsystems ist deshalb auch die derzeit weit verbreitete und bewährte Anwendung von Lebendvaccinen nicht ganz unproblematisch. Zwar treten Impferkrankungen, die früher häufig in USA beobachtet wurden, kaum mehr auf, aber eine Immunsuppression und der diaplacentare Impfvirustransfer mit nachfolgender Schädigung des Fötus können durch Lebendimpfstoffe verursacht werden (32, 39, 69, 84). Darüber hinaus muß immer mit der Ausscheidung von Impfvirus gerechnet werden. Persistent infizierte und immuntolerante Tiere (2-5 % aller infizierten Tiere) sind das größte Problem im Rahmen von Bekämpfungsprogrammen, und sollten im Idealfall identifiziert und ausgemerzt werden (4, 84).

Die Stomatitis papulosa (bovine papular stomatitis, BPS), als mild verlaufende Parapockenvirus-Erkrankung der Rinder und wild lebender Wiederkäuer beschrieben, ist weltweit verbreitet und durch einen hohen Prozentsatz latenter Infektionen charakterisiert (10, 16, 52).

Eine klinisch manifeste Stomatitis papulosa beeinträchtigt befallene Tiere zwar nicht erheblich, kann aber durch Sekundär- und Mischinfektionen Leistungsminderungen nach sich ziehen (52). Darüberhinaus muß berücksichtigt werden, daß es sich um eine Zoonose handelt (38).

Eine Schutzimpfung gegen die Stomatitis papulosa war bisher nicht üblich, sie wurde erst durch die Entwicklung eines attenuierten Parapoxvirus-Stammes durch Mayr möglich. Dieser Impfvirus-Stamm zeichnet sich zudem durch eine starke paramunisierende Wirkung aus (16, 46).

BVD/MD-Erkrankungen begünstigen sehr häufig durch ihre immunsuppressive Wirkung den Ausbruch anderer meist latenter Infektionskrankheiten, insbesondere auch der Stomatitis papulosa (10, 12).

Die wirksame prophylaktische Bekämpfung derartiger synergistisch verlaufender Infektionskrankheiten gelingt am besten mit sog. funktionell-synergistischen Kombinationsvaccinen.

Aus diesem Grunde wurde von Mayr et.al. ein Kombinationsimpfstoff entwickelt, der die 2 genannten Virusarten in vermehrungsfähiger Form enthält.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Unschädlichkeit und Wirksamkeit dieser Vaccine in geeigneten in vitro- und in vivo-Testen sowie im Feldversuch zu prüfen.

2. Schrifttum

Wesen und Wirksamkeit von Kombinationsvaccinen

2.1. Kombinationsvaccinen, Begriffsbestimmung, Wesen und Bedeutung

Über die Fähigkeit des Säugerorganismus auf eine enorm große Fülle externer wie interner Antigene zu reagieren und schließlich eine Immunität auszubilden, sind mehrere Theorien aufgestellt worden. Nach Jerne wird dieses Phänomen durch ein Netz interagierender Idiotypen im Immunsystem erklärt (28). Von außen auf dieses Netzwerk treffende Antigene sollen durch idiotypische Strukturen nachgeahmt werden, und diese können die Entwicklung der Immunität anregen.

Daß dies durch mehrere gleichzeitig inkorporierte Antigene simultan und unabhängig geschehen kann, hat die Entwicklung von sogenannten Mehrfachimpfstoffen ermöglicht (23, 53, 72, 74).

Nach A. Mayr (53, 54) gliedert man die Mehrfachimpfstoffe in zwei Gruppen:

1. die polyvalenten Impfstoffe und
2. die Kombinationsimpfstoffe

Unter polyvalenter Vaccine versteht man eine aus verschiedenen Serotypen ein und desselben Erregers zusammengestellte Vaccine, wie z.B. die in der Bundesrepublik Deutschland eingesetzte Maul-und Klauenseuche-Vaccine aus den Serotypen A, O und C.

Kombinationsvaccinen dagegen setzen sich aus Mikroorganismen oder antigen wirkenden Makromolekülen unterschiedlicher Erregerspezies zusammen.

Nach ihrer Funktion lassen sich Kombinationsvaccinen wiederum in 2 Gruppen unterteilen:

1. Numerisch-additive Kombinationsvaccinen und
2. Funktionell-synergistische Kombinationsvaccinen

Unter den Mehrfachimpfstoffen (multiple component vaccines) werden die numerisch-additiven Vaccinen von den polyvalenten Impfstoffen (Serotypen einer Erregerspezies) abgegrenzt. Innerhalb der Gruppe der numerisch-additiven Kombinationsvaccinen ist eine Einteilung in reine Virusantigen-, reine Bakterienantigen-, oder Toxoid-Kombinationen sowie die verschiedensten Mischungen aller drei Antigentypen möglich. Eine Zusammenstellung bewährter Vaccinen dieses Typs wurde von Benary 1975 angefertigt (8).

Eine numerisch-additive Kombinationsvaccine besteht aus zwei oder mehr Antigenen, Erregern, Toxoiden oder Spaltprodukten von Erregern die unabhängig voneinander als isoliertes Antigen eine belastbare Immunität gegen den Erreger einer spezifischen Infektionskrankheit stimulieren können, aus wirtschaftlich-technischen Gründen und zugunsten des Impfings (nur ein Impfstoff) aber als Kombinationsvaccine in Gebrauch sind. Numerisch-additive Kombinationsvaccinen sind in der Tiermedizin in der Bundesrepublik Deutschland derzeit in großer Vielfalt, besonders zur Bekämpfung der klassischen Infektionskrankheiten bei Hund und Katze, auf dem Markt.

Das Auftreten infektiöser Faktorenkrankheiten hat die Tiermedizin gezwungen, neue Bekämpfungsstrategien, z.B. gegen multikausale Infektionskrankheiten, zu entwickeln. Der Einsatz von Impfstoffen gegen nur einen bekannten pathogenen Erreger führt bei Krankheiten wie der Rinder Grippe, dem Hustensyndrom der Pferde oder dem Zwingerhusten, nicht mehr zum Erfolg. Aus diesem Grund wurden von Mayr et al. sogenannte funktionell-synergistische Kombinationsimpfstoffe entwickelt. (54).

Diese neue Art der Kombinationsvaccinen soll möglichst alle wichtigen am Zustandekommen einer multikausalen Infektionskrankheit beteiligten Erreger und Leitkeime enthalten und garantiert erst durch ihren speziell auf die Eigenart einer solchen Krankheit abgestimmten Antigengehalt den Impferfolg.

Dabei stammen die einzelnen Antigene nicht nur von obligat-pathogenen Erregern, sondern hauptsächlich fakultativ-pathogene-Erreger-Komponenten geben diesen Impfstoffen ihre besondere Note. Diese Mikroorganismen werden vielfach nur als ubiquitäre, unter "normalen Umständen" harmlose Kommensalen beurteilt. Mischinfektionen mit derartigen Erregern können durch das Zusammenwirken mit exogenen oder endogenen immunsuppressiven Noxen in Krankheiten übergehen.

Eine durch funktionell-synergistische Kombinationsvaccinen induzierte, breit gefächerte Wirkung auf das Abwehrsystem beinhaltet neben meist kurzfristigen, paraspezifischen Effekten den Aufbau einer Immunität gegen bestimmte Basisinfektionen sowie gegen regelmäßig synergistisch mit diesen korrespondierenden sog. "Partnerinfektionen". Sehr wichtig ist die richtige Auswahl der Antigen-Zusammenstellung in einer funktionell-synergistischen Kombinationsvaccine. Sie sollte auf das jeweilige Einsatzland oder -Gebiet bezogen sein und solche Basiserreger berücksichtigen, die bei einem hohen Prozentsatz der betroffenen Population immer wieder nach natürlicher Infektion zu Immunreaktionen führen (Nachweis z.B. durch Antikörperanstiege) und ferner wenigstens ein Antigen enthalten, von dem eine positive Wirkung auf die unspezifische Infektabwehr bekannt ist (53, 54).

Nicht alle als funktionell-synergistisch bezeichneten Kombinationsvaccinen können diese Forderungen erfüllen. Durch den alleinigen Zusatz eines fakultativ-pathogenen Erregerantigens kann noch nicht die Wirkung einer Vaccine im vorher genannten Sinn zustandekommen.

Kombinationsvaccinen nehmen einen immer breiteren Raum bei der Infektionsprophylaxe ein und verdrängen in neuerer Zeit immer mehr monospezifische Impfstoffe. Am sinnvollsten erscheint eine Einteilung der Kombinationsvaccinen nach der Art ihres Antigengehalts und ihrer Wirkung.

2.2. Kombinationsvaccinen aus vermehrungsfähigen Erregern

Numerisch-additive Kombinationsvaccinen aus vermehrungsfähigen Erregern sind in der Regel für Anwendungsbereiche entwickelt worden, für die eine Wirkungslosigkeit inaktivierter Antigenkompositionen nachgewiesen ist.

Die Kombination vermehrungsfähiger Impfkkeime ist nur in numerisch-additiven Vaccinen sinnvoll, da unter bestimmten Bedingungen nach Applikation vermehrungsfähiger Erreger als funktionell-synergistische Kombinationsvaccine Interaktionen mit opportunistischen, ubiquitären Umweltkeimen (z.B. Konjugation, Hybridisierung) vorkommen können, und so der Erfolg mit diesem Vaccinotyp in Frage gestellt ist. Die Risiken bei diesen Kombinationsvaccinen können durch Einsatz heterologer, vermehrungsfähiger Erreger stark vermindert werden (47).

Kombinierte Vaccinen aus vermehrungsfähigen Erregern sollen nur dann eingesetzt werden, wenn entsprechende Impfstoffe aus inaktivierten Erregern nicht verfügbar oder nicht ausreichend wirksam sind. Trotzdem sind heute einige Kombinationsimpfstoffe aus vermehrungsfähigen Erregern wegen ihrer hervorragenden Wirksamkeit aus der modernen Tiermedizin nicht wegzudenken, vielmehr müssen sie als Notimpfung, bei frisch ausgebrochenen Erkrankungen, insbesondere in der Massentierhaltung, als Mittel der Wahl gelten, sofern sichergestellt ist, daß möglicherweise ausgeschiedene Erreger nicht verschleppt werden können. (53, 78, 91).

In der Humanmedizin ist hier besonders die Kombination von Pocken- mit Masernvaccine zu erwähnen, die in den 60ziger Jahren in Entwicklungsländern aus Kostenu. Personalgründen vermehrt eingesetzt wurde und ausgezeichnete Erfolge brachte. (63).

Nach dem Auftreten der Parvovirose beim Hund wurde vermehrungsfähiges Parvovirus attenuiert und verschiedene Parvovirus-Impfstämme entwickelt. Derzeit werden diese Impfstämme mit einer Reihe anderer, zur aktiven Schutzimpfung der Hunde seit langem eingesetzter Impfstämme in inaktivierter oder vermehrungsfähiger Form kombiniert. Eine neue Kombinationsvaccine ausschließlich aus vermehrungsfähigen Erregern, die neben Parvovirus (Cornell Stamm) Leptospiren, Bakterien sowie Staupe-, Hepatitis- und Parainfluenzavirus enthielt wurde von Kahn et al., 1983 geprüft. Die Vaccine erwies sich als unschädlich, und stimulierte eine Immunantwort gegen alle Impfantigene. Gegen oronasale Belastung mit virulenten Parvovirus waren alle Hunde geschützt (31). Vermehrungsfähige Parvovirusimpfstämme in Kombination mit vermehrungsfähigem Staupevirus (Snyder-Hill Stamm) haben jedoch in letzter Zeit Zweifel über ihre Unschädlichkeit aufgeworfen (s. Kap. 2.5.1.). Heute werden deshalb Kombinationsvaccinen, die nur vermehrungsfähige Erreger enthalten bei der Prophylaxe der wichtigsten Hunde- und Katzen-Infektionskrankheiten selten eingesetzt; es überwiegen die Kombinationsimpfstoffe aus vermehrungsfähigen und inaktivierten Erregern (s. Kap. 2.4.).

Zur Schutzimpfung von Rindern, speziell mit dem Ziel einer frühen, wirksamen Prophylaxe nach der Aufstallung von Masttieren, wurde die Kombination vermehrungsfähiger Impfstämme des BVD/MD-Virus, des IBR-Virus und des Parainfluenza-Virus Typ 3 (PI-3) von Terpstra et al. 1982 unter Feldbedingungen an 782 Mastkälbern im Alter von 10-14 Tagen erprobt. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß eine frühzeitige Schutzimpfung kurz nach dem Aufstallern mit dieser Kombinationsvaccine die Morbidität und Mortalität unter den Impfungen in den ersten Wochen p.vacc. unwesentlich beeinflußt, und daher nicht verantwortet werden kann (85).

Ferner wurde der Nutzen kombinierter Vaccinen aus vermehrungsfähigen PI-3- und IBR-Virus auf die Behandlungsraten und den Medikamenteneinsatz bei Masttieren in groß angelegten Feldversuchen als nicht signifikant gegenüber ungeimpften Kontrolltieren angesehen. Die zusätzliche Anwendung vermehrungsfähiger BVD/MD-Vaccinen (simultan zur IBR/PI-3 Kombinationsvaccine) verursachte eine deutliche Zunahme der Erkrankungsrate bei Masttieren unter Stressbedingungen wie aus einer kanadischen Feldstudie hervorgeht (43, 44).

Die intranasale Impfung mit einer IBR/PI-3 Kombinationsvaccine von ca. 1700 zum Teil trächtigen Schafen einer Problemherde mit hohen Verlusten (respirat. Erkrankungen) an Lämmern und eine 3 Monate spätere Impfung mit vermehrungsfähigem BVD/MD Virus wurde bezüglich Antikörperbildung und Einfluß auf die Herdengesundheit positiv bewertet (79).

Der Einsatz vermehrungsfähiger IBR-Virus-Impfstämme in Kombinationsvaccinen mit anderen vermehrungsfähigen Antigenen (i.d.R. Viren) hat zwar keinen negativen Einfluß auf die Antikörperbildung gegen diese Antigene gezeigt, wird aber wegen der Gefahren durch vermehrungsfähige Herpesviren (lebenslange Persistenz, Ausscheidung) nicht empfohlen. (42, 60, 91).

Bei der Bekämpfung respiratorischer Erkrankungen des Rindes wurde immer wieder die pathogene Rolle von Bakterien der Gattung *Pasteurella* hervorgehoben. Kombinationsvaccinen aus vermehrungsfähigen, meist attenuierten Stämmen der wichtigsten pathogenen Virusarten und vermehrungsfähigen *Pasteurella*-Bakterien wurden schon seit längerer Zeit erprobt. (41, 58). Mayr et al. (1969) beurteilten die Ergebnisse von Feldversuchen zwar generell positiv, lehnten aber die Impfung sehr junger Kälber (1-5 Wochen) ab. Eine mit Saponin versetzte Versuchsvaccine aus BVD/MD, Parainfluenza-3 und *Pasteurella haemolytica* Erregern in vermehrungsfähigem Zustand verursachte Gewebereizungen an der Impfstelle und vorübergehendes Fieber. (58). Mittlerweile sind in der BRD parenterale Impfversuche mit *Pasteurella*-Kombinationsvaccinen wegen der schlechten Verträglichkeit dieser Impfstoffe eingestellt worden. Eine gute Alternative bietet aber die intranasale Applikation von *Pasteurella*-*haemolytica*-Impfbakterien, die auch mit IBR-Vaccinen gut kombinierbar sind (Baljer, pers. Mitteilung).

Allgemein wird auch in der Großtierpraxis immer mehr angestrebt, Kombinationsvaccinen aus inaktivierten Erregern einzusetzen, besonders wenn Vaccinen entwickelt werden sollen, die immunologisch und pathogenetisch problematische Antigene enthalten (IBR, BVD/MD u.ä.).

2.3. Kombinationsvaccinen aus inaktivierten Erregern

In dieser Impfstoff-Gruppe gibt es ebenfalls sowohl numerisch-additive als auch funktionell-synergistische Vaccinen.

Ursprünglich dachte man bei der Entwicklung von Impfstoffen aus inaktivierten Erregern in erster Linie an die Prophylaxe all jener Infektionskrankheiten, gegen die der Einsatz vermehrungsfähiger (in der Regel attenuierter) Erreger zu risikoreich erschien oder sogenannte Lebend-Impfstoffe nicht entwickelt werden konnten.

Heute stehen gegen viele Infektionskrankheiten der Tiere beide Vaccinetypen zur Verfügung. Nach dem Grundsatz "primum nil nocere" sollte nach Berücksichtigung aller epidemiologischer, pathogenetischer und immunologischer Kriterien, im Zweifelsfalle vom Einsatz von vermehrungsfähigen Erregern abgesehen werden.

2.3.1. Numerisch-additive Kombinationsvaccinen

Dieser Impfstofftyp repräsentiert derzeit die größte Gruppe der Kombinationsvaccinen aus inaktivierten Erregern. Eine einfache Mischung der Antigene der wichtigsten pathogenen Erreger in inaktiviertem Zustand bot sich als billigste und technisch-biologisch problemloseste Möglichkeit der Kombinationsvaccinen-Produktion an. Es ist erstaunlich, welche extrem unterschiedlichen Mikroorganismen kombinierbar waren, ohne daß das Phänomen der sogenannten "Antigen-Konkurrenz" Auswirkungen auf die Wirksamkeit der Vaccinen hatte (1, 8, 23, 27, 72, 74). Darüberhinaus werden einzelne Erreger oft nach ganz unterschiedlichen Methoden inaktiviert; Spuren von Inaktivierungsmitteln verbleiben im Impfstoff und meist werden noch Adjuvantien und Stabilisatoren zugesetzt. Alle diese Manipulationen dürfen sich in der Kombinationsvaccine nicht nachteilig auf die Unschädlichkeit und Wirksamkeit bezüglich aller enthaltenen Antigene auswirken. In der Tiermedizin wurden praktisch für alle Haus- und Nutztierarten unschädliche und gut wirksame numerisch-additive Kombinationsvaccinen entwickelt.

Zu den bekannten numerisch-additiven Kombinationsvaccinen aus inaktivierten Erregern kommen praktisch jährlich einige Neuentwicklungen hinzu.

Zur aktiven Schutzimpfung beim Schwein wurde 1985 von der Fa. Hoechst eine Kombinationsvaccine aus Influenza- und Aujeszkyvirusantigen (Arraflu) als Reaktion auf die zunehmende Bedeutung der Grippeerkrankungen bei dieser Tierart in der BRD zugelassen. Eine andere Kombination mit inaktivierten Aujeszkyvirus und porcinem inaktivierten Parvovirus wurde bisher mit gutem Erfolg beim Schwein getestet (25, 62).

Neu entwickelt und vermarktet zur Schutzimpfung von Wiederkäuern wurde eine Kombination (Aitorab^R, Fa. IFFA MERIEUX) von Maul- und Klauenseuchevirus mit dem Tollwutvirus (72).

Ausgezeichnet bewährt hat sich inzwischen eine Neuentwicklung aus inaktiviertem Rota- und Coronavirus sowie Parvovirus und dem E. coli K99-Pilusantigen, eingesetzt als kombinierte "Muttermilchvaccine" beim Rind zum Schutz der Kälber vor neonatalen, enteralen Mischinfektionen (2, 5). Muttertier-Schutzimpfungen mit Kombinationen aus inaktivierten Erregern mit dem Ziel optimaler Immunglobulinsekretion in der Milchdrüse und verlängerter Antikörper(-)übertragung haben bei Wiederkäuern (Placentation) besondere Bedeutung, werden aber auch bei anderen Tierarten erfolgreich angewandt (5, 49, 53).

Zur Bekämpfung der Folgen bakterieller Infektionen spielen prophylaktische Impfungen mit inaktivierten Bakterientoxinen (Toxoide) eine große Rolle. In der Tiermedizin wurden zur Bekämpfung von Clostridienintoxikationen beim Schaf eine Reihe von kombinierten Toxoidimpfstoffen entwickelt (88, 90). Die zusätzliche Kombination dieser Toxoide mit Pasteurella haemolytica Antigen ließ die Wirksamkeit der Toxoide beim Schaf unbeeinflusst (89).

In der Humanmedizin spielen Kombinationen mit dem Tetanus- und Diphtherie-Toxoid die größte Rolle (88). Es wurden Kombinationsvaccinen gegen die wichtigsten Erreger der Kinder-Infektionskrankheiten mit Erfolg entwickelt. Die bewährte Dreifach-Vaccine Diphtherie-Tetanus-Poliomyelitis (DTP) wurde durch Zusatz von Bordetella-Pertussis Antigen oder Masern-Spaltvaccine zur Vierfach- bzw. Fünffach-Vaccine weiterentwickelt, wobei diese Vaccine sogar die immunisierende Wirkung der Masernkomponente verbessern konnte (3).

2.3.2. Funktionell-synergistische Kombinationsvaccinen

Zur Bekämpfung der sog. enzootischen Bronchopneumonie des Rindes wurde eine funktionell-synergistische Kombinationsvaccine aus den inaktivierten Viren, Parainfluenza-3, Reovirus Serotyp 1 und 3 sowie bovinem Adenovirus Typ 1, 3 und 5 (Bovigrip^R, Hoechst) unter Feldbedingungen eingesetzt und ein Impfschema entwickelt (7). Gegen alle Impfantigene wurde eine serologisch nachweisbare Immunantwort ermittelt. Die Krankheitsfälle wurden bei den Impfungen erheblich vermindert.

Ein weiteres Beispiel für eine neu entwickelte, funktionell-synergistische Kombinationsvaccine ist eine von Thein und Mayr erfolgreich gegen Atemwegsinfektionen beim Pferd eingesetzte Antigenkomposition aus inaktiviertem equinem Rhinopneumonitis-Virus, Reovirus Serotyp 1 und 3 und den Influenzaviren A equi 1 und 2 (86).

Auch in der Kleintierpraxis brachten Haltungs- und Aufzuchtgepflogenheiten das Problem mit sich, prophylaktisch einen Komplex infektiöser Erkrankungen wirksam bekämpfen zu müssen. In den Hunde-Zuchtbetrieben sind das sog. "infektiöse Welpensterben" und der "Zwingerhusten" Problemkrankheiten die durch neue Prophylaxe- und Therapiemethoden bekämpft werden mußten. Mayr-Bibrack konnte 1979 mit einer funktionell-synergistischen Kombinationsvaccine aus inaktivierten Reoviren (Serotyp 3), Parainfluenza-2-Viren und humanen Influenzaviren (H3 N2) die Zwingerhusten-Basisinfektion in umfangreichen Praxisversuchen erfolgreich bekämpfen. Gegen das infektiöse Welpensterben hat sich die Paramunisierung noch nicht impffähiger Jungtiere hervorragend bewährt (45, 49).

Der große Vorteil funktionell-synergistischer Kombinationsvaccinen liegt in ihrer situationsangepassten Antigenkomposition, die i.d.R. auch die Stimulation erregerspezifischer Abwehrmechanismen beabsichtigt, und der fundierte infektionsmedizinische Studien in den vorgesehenen Einsatzgebieten vorangegangen sind. Für diesen Vaccinotyp wird mit der Zunahme veränderter Umwelt- und haltungsbedingter Situationen in der Tierzucht (vermehrte Stallhaltung, große Populationsdichte u.ä.) mit den entsprechenden mikrobiologischen Konsequenzen (z.B. endemischer Hospitalismus) größerer Bedarf bestehen (45).

2.4. Kombinationsvaccinen aus vermehrungsfähigen und inaktivierten Erregern

Neben der großen Fülle an Kombinationsmöglichkeiten mit Antigenen gleichen Aktivitätszustandes ist auch die Mischung vermehrungsfähiger mit inaktivierten Erregern ohne negative Wirkung auf Unschädlichkeit und Wirksamkeit einer derart "gemischten Kombinationsvaccine" möglich. In der Tiermedizin repräsentieren diese Vaccinen sogar die größte Gruppe unter den kombinierten Impfstoffen. Bei diesen Vaccinen überwiegt i.d.R. der Anteil inaktivierter Antigene und meist ist nur ein vermehrungsfähiger Erreger enthalten. Eine Zusammenstellung bewährter, im Handel seit Jahren erhältlicher, Kombinationsvaccinen aus inaktivierten und vermehrungsfähigen Antigenen zur Prophylaxe verschiedenster Infektionskrankheiten bei Mensch, Pferd, Rind, Schaf und Hund ist von Benary, 1975, veröffentlicht worden (8).

Von den neu entwickelten Kombinationsvaccinen dieses Typs soll eine von Zygraich et al. 1985 geprüfter, 6 verschiedene Antigene enthaltende Vaccine zur Prophylaxe der zur Zeit bedeutendsten Infektionskrankheiten des Hundes erwähnt werden. Der Impfstoff enthält im Gegensatz zu üblicher Praxis nur zwei inaktivierte Antigene (*Leptospira canicola* und *L. icterohaemorrhagiae*) aber vier vermehrungsfähige Virusarten: Canines Parvovirus, Adenovirus Typ 2, Staupevirus und canines Parainfluenzavirus. Die Unschädlichkeit und Wirksamkeit wurde bisher nur an 4 Beagle- und 7 Mongrel-Hunden getestet, hatte aber protektive Wirkung gegen eine Belastungsinfektion mit 3 virulenten Parvovirusstämmen (92).

Zufriedenstellend immunogene Antigene können nicht von jedem Mikroorganismus nach einer Inaktivierung gewonnen werden. Bei einigen Erregern geht bei den derzeit üblichen Inaktivierungsmethoden mit dem Verlust der Vermehrungsfähigkeit auch eine Inaktivierung der immunisierenden Strukturen einher. Dies trifft z.B. für Pockenviren zu, deshalb mußten zur Schutzimpfung des Menschen unschädliche stark attenuierte Impfstämme entwickelt werden. Ein solcher Impfstamm (MVA) konnte ohne Bedenken mit Tetanus-Toxoid kombiniert werden (88).

Leider konnte auch von BVD/MD-Virus und anderen verwandten Togaviren (europ. Schweinepestvirus) noch kein gut wirksames, inaktiviertes Antigen gewonnen werden, sodaß bis heute in Kombinationsvaccinen aus inaktivierten Erregern ein BVD/MD-Anteil möglichst aus vermehrungsfähigen Impfstämmen bestehen sollte, um ausreichend gut zu immunisieren.

Wegen möglicher immunsuppressiver Wirkung ist die BVD/MD-Komponente in vermehrungsfähigen Zustand jedoch nicht wahllos mit irgendwelchen anderen Antigenen kombinierbar (20, 43).

Auch die Verwendung attenuierter boviner Herpesviren als Impfantigen hat wegen der lebenslangen Persistenz dieser Virusart im Organismus in letzter Zeit besonders als Prophylaxe bei Zuchtrindern Diskussionen ausgelöst. Zur Vermeidung der weiteren Zunahme von IBR/IPV-Virusträgern in der Rinderpopulation empfiehlt es sich, abgesehen von Notimpfungen, gegen diese Erkrankung prophylaktisch nur Kombinationsvaccinen mit inaktivierten IBR/IPV-Erregern einzusetzen (60, 91).

2.5. Interaktionen bei Kombinationsvaccinen

2.5.1. Einflüsse, die von den Vaccinekomponenten ausgehen

Untersuchungen über Interaktionen bei Kombinationsimpfstoffen aus inaktivierten und attenuierten Erregern, die versuchsweise eingesetzt wurden, reichen bis Mitte der sechziger Jahre zurück (24, 27).

Diese Kombinationsvaccinen enthielten bis zu 5 verschiedene Antigene (23). In erster Linie wurden Potenzierungseffekte bei der Immunantwort auf Impfung mit Kombinationsvaccinen vergleichend zu den Reaktionen auf die Einzelantige Beachtung geschenkt.

Es wurden Unschädlichkeits- und Wirksamkeitsprüfungen an kleinen Labortieren vorgenommen und die Vaccinen schließlich im Feldversuch am vorgesehenen Impfling geprüft.

Insgesamt wurden bis heute wenig Anstrengungen unternommen die Wirkungen einzelner Antigenkomponenten der Kombinationsvaccinen "in vitro", z.B. an Zellkulturen, zu untersuchen. Synergistische Wirkungen einzelner Vaccinekomponenten bezüglich besserer Ausbildung spezifischer Reaktionen des Immunsystems -hauptsächlich der Antikörperbildung- wurden häufig beobachtet (1, 22, 74). Als Beispiele für die Wirksamkeit bei der Stimulation einer Antikörper-abhängigen Immunität seien einige Kombinationsvaccinen genannt, deren Einzelantigene als monospezifischer Impfstoff vergleichend schlechter abschnitten:

Ein Masern-Spaltantigen konnte bei Prüfung an Meerschweinchen als Bestandteil einer Fünffachvaccine (Tetanus, Diphtherie, Keuchhusten u. Poliomyelitis) eine 2- bis 4-fach höhere Wirkung erzielen als in einer monospezifischen Vaccine (3).

Auch bei Toxoid-haltigen Kombinationsvaccinen wird oftmals von positiven Einflüssen anderer Vaccinekomponenten auf die Antikörperbildung gegen bestimmte Toxoide berichtet (26, 88).

Bei der Prüfung einer Fünffach-Vaccine aus 4 Virusanteilen (Staupe, Hepatitis, Parainfluenza und Parvo) und einer bakteriellen Komponente (*Leptospira*) an 33 Hunden wurden bei der Versuchsgruppe, die alle Antigene als Kombination erhalten hatte, höhere Antikörpertiter als bei Tieren, die nur einzelne Antigene geimpft bekamen, gefunden (82). Bei neu entwickelten Kombinationsvaccinen werden heute verstärkt vergleichende Untersuchungen mit enthaltenen Einzelantigenen angestellt (88, 92). Dabei wurde allerdings auch negative gegenseitige Beeinflussung festgestellt (27, 36, 60, 65, 76).

Seit Antigenmischungen auf Unschädlichkeit und Wirksamkeit geprüft werden, beschäftigt man sich mit der sog. "Antigen-Konkurrenz" (27).

Das Phänomen der Antigen-Konkurrenz (Antigen competition) wurde 1904 von Michaelis (64) erstmals beschrieben. Seitdem wurden eine Reihe von Einzelexperimenten hinsichtlich der gegenseitigen Behinderung oder Konkurrenz unterschiedlichster Antigene durchgeführt, von denen aber keine allgemein gültigen Folgerungen abgeleitet werden können. Die meisten Konkurrenz-Phänomene sind stark dosisabhängig.

Durch zu hohe Antigenmengen kann leicht immunologische Toleranz erzeugt werden. Die Konkurrenz antigenen Determinanten ist meist am stärksten ausgeprägt, wenn diese auf dem gleichen Molekül sitzen, oder wenn zwei Antigene in kurzen Zeitintervallen verabreicht werden (27). Antagonistische Wirkungen werden am häufigsten bei Kombinationsvaccinen aus attenuierten oder "gemischten" attenuierten und inaktivierten Erregern beobachtet. Dabei spielt das Problem der homologen bzw. heterologen Interferenz die größte Rolle. (27, 65, 74, 76).

Über eine "in vitro" -Antigen- Abschwächung berichtete Schmidt 1967 nach einem Lagerungsversuch mit einer Influenza-Tetanus-Kombinationsvaccine. Die Influenza-Komponente war nach zwei- bis vierwöchiger Lagerung in der Wirkung stark abgeschwächt; wurden jedoch Mäuse mit einer frisch zubereiteten Influenza-Tetanus-Vaccine intraperitoneal geimpft so war die Influenza-Antigenität voll erhalten. Der Autor folgert daraus, daß Tetanus-Toxoide, die länger auf Influenza-Antigen einwirken dessen Immunogenität allmählich schädigen (81).

Die Abhängigkeit der antigenen Wirksamkeit von den Mengenverhältnissen einzelner Komponenten in den Kombinationsvaccinen wurde vielfach dokumentiert (27, 74).

1963 verglich Bittner die Wirksamkeit einer monovalenten Clostridien-Vaccine mit einer Kombinationsvaccine an Schafen, Kaninchen, Meerschweinchen und Mäusen. Die Impfdosis in den Einfachimpfstoffen betrug 100 - 250 Lb pro Milliliter für das Clostridium perfringens Toxoid und Clostridium novyi Toxoid und 90 - 900 Lb pro ml für das Clostridium-septicum-Toxoid. Die Kombinationsvaccine aus den drei Toxoiden lieferte bei gleicher Dosierung 2 - 3fach niedrigere Antitoxinspiegel als die entsprechenden monospezifischen Impfstoffe. Enthielt die Kombinationsvaccine nur die halbe Toxoid-Dosis, dann immunisierte sie ebenso gut wie die monospezifischen Impfstoffe. (9).

Nedjalkov et al (1973) impften 2 x innerhalb von 15 Tagen Schafe mit 3 ml einer Kombinationsvaccine aus Clostridium perfringens, Typ C- und D- und Clostridium novyi-Toxoid. Clostridium perfringens und Clostridium novyi unterdrückten die Anti-Toxoid-Antikörper-Bildung gegen Clostridium perfringens D. Wurde die Dosis von Clostridium perfringens D - Toxoid erhöht, so führte dies zum Nachlassen der Immunantwort gegen die beiden anderen Antigene. (68).

Immunsuppressive Eigenschaften bestimmter Erreger (z.B. Vermehrung in lymphatischen Zellen) müssen bei der Entwicklung von Kombinationsvaccinen natürlich ebenfalls berücksichtigt werden.

Krakovka beobachtete, daß Hunde, die gegen Parvovirose und Staupe mit einer Kombinationsvaccine aus attenuierten Erregern geimpft waren, Anzeichen einer durch Staupeviren verursachten Enzephalitis zeigten. (36). Gegenseitige negative Beeinflussung zeigten auch attenuiertes Staupe- und Hepatitisvirus bei kombinierten Hundevaccinen (1). Derartige Interaktionen lassen sich durch Inaktivierung (HCC-Komponente) oder Einsatz vermehrungsfähiger, heterologer Impfantigene (z.B. zur Staupeimpfung-Masernvirus) vermeiden.

Unglücklicherweise gibt es Erreger (z.B. BVD/MD-Virus) deren negative Eigenschaften auf diese Weise noch nicht ausgeschaltet werden konnten.

Eine Hitzeinaktivierung von Parainfluenza-3 und BVD-MD-Virus wurde von U. Kießling versucht. Den inaktivierten Antigenen wurden keine Adjuvantien und Stabilisatoren zugesetzt; 10 Kaninchen wurden mit 2 ml dieser Kombinationsvaccine subcutan geimpft. Die Bildung eines Antikörper-Titers konnte nicht festgestellt werden. Bei diesen Versuchen wurde ebenso ein monospezifischer Impfstoff aus hitzeinaktivierten BVD-MD- Virus erprobt. Kaninchen, Meerschweinchen und Hühner wurden mit 1 ml Vakzine 2 x im Abstand von 2 Wochen geimpft; jedoch in keinem Falle kam es zur Ausbildung von Antikörpern. Da BVD-MD-Virus bei der Inaktivierung sehr leicht so geschädigt werden kann, daß die Immunogenität ausbleibt, mag hier eine derartige Antigen-Schädigung vorgelegen haben. (34).

Neue Techniken (Gentechnologie, Immunmodulatoren) können Auswege in der Impfstoffentwicklung mit derartigen Problemkeimen bieten.

2.5.2. Einflüsse die vom Impfling ausgehen.

Der "Zustand" des Impflings wird in der Veterinärmedizin vor einer Impfung in der Regel durch kurze klinische Untersuchung, in der Nutztierhaltung meist durch eine Bestandsbeurteilung, als "impffähig" oder erkrankt und "nicht impffähig" beurteilt. Die Einschätzung immunologischer wie immuno-pathologischer Gegebenheiten gestaltet sich wegen der oft schlechten Anamnese-möglichkeiten (Allgemeinbefinden kann nicht erfragt werden) besonders bei der Massentierhaltung für den Tierarzt schwierig.

Voraussetzung für den Erfolg einer Kombinationsimpfung ist natürlich eine "normale" Reaktion des Impflings auf die antigenen Reize. Bei gesunden Individuen ist eine optimale Antigenverarbeitung nach der Inokulation z.B. über Makro- und Mikro-phagen gewährleistet, die sich dann über selbst synthetisierte Transmittersubstanzen als Signal weiterleitet und je nach überwiegender B- oder T-Zellproliferation und -Aktivierung, mit letztlich zum Schutz ausreichender spezifischer Antikörperproduktion oder als T-zellabhängige zelluläre Abwehrform auswirkt. Bezüglich der immunologischen Leistung gibt es genetisch verankerte, ganz erhebliche Rasseunterschiede (15). An exogenen, veränderlichen, das Immunsystem beeinflussende Faktoren seien die Tierhaltungs-Bedingungen wie Klima, Räumlichkeiten, Fütterung (z.B. richtige Vitaminversorgung) u.a.m. genannt. Ein wichtiger Einfluß auf die Gesunderhaltung des Immunsystems wird durch regelmäßiges sog. "Training" der Infektabwehr ausgeübt. (51, 53).

Disposition von Individuum und Rasse spielen dabei eine ebensowichtige Rolle wie ausgewogene Ernährung und vollständige Ausbildung eines altersabhängigen kompetenten Immunsystems (15).

Eine große Rolle spielen, unabhängig vom Einsatz monospezifischer oder kombinierter Vaccinen, zirkulierende maternale Antikörper im Kreislauf neonataler Tiere. Diese mehr oder weniger individuell ausgeprägte Beeinflussung der Ausbildung einer aktiven Immunität nach erfolgter Impfung wird im Falle der BVD-MD kontrovers beurteilt, und hat schon zur Forderung der Antikörper-Status-Bestimmung jedes Impflings vor der Impfung geführt (61, 84).

Bei der heutigen Massentierhaltung ist dies wohl schwer durchführbar, jedoch in Stichprobenuntersuchungen sehr aufschlußreich bezüglich der Persistenz maternaler Antikörper gegen die unterschiedlichsten Erreger bei den Nachkommen. Die Erstellung durchdachter Impfkalender berücksichtigt diese Tatsache soweit dies im Rahmen der tiermedizinischen Praxis durchführbar ist (48). Exogene immun-suppressive Einflüsse jeglicher Art aus der Umwelt müssen der "physiologisch-behindernden Wirkung" maternaler Antikörpern bei Ausbildung eigener aktiver Immunität gegenübergestellt werden; sie betreffen natürlich Tiere aller Altersgruppen und wirken individuell sehr unterschiedlich.

Für den Fall einer bereits vorhandenen aktiven Immunität gegenüber einer der Kombinations-Vaccine-Antigenkomponenten wurde eine verminderte Immunantwort gegen andere Vaccine-Antigene auf Grund einer Boosterreaktion postuliert (27, 74). Dieser sogenannte "Verdrängungseffekt" konnte aber von der Amerikanischen Veterinär-Biologie-Behörde bei 17 Lizenzanträgen mit allen geprüften kombinierten Antigenen an mehr als 600 Hunden serologisch nicht bestätigt werden. (1, 71).

2.6. Wirkungen von (immun) modulierenden Zusätzen bei Kombinationsvaccinen

Immunmodulatoren sind Substanzen, die weder als Antikörper noch als Antigen wirksam sind und welche die für eine Immunitätsbildung verantwortlichen Systeme positiv oder negativ beeinflussen; sie haben überall dort Bedeutung, wo eine erwünschte Immunreaktion verstärkt, oder eine unerwünschte Immunreaktion unterdrückt werden soll. (51). In erster Linie sind Immunmodulatoren, hauptsächlich Adjuvantien, eingesetzt worden, um die immunisierenden Antigene inaktivierter Erreger in ihrer Wirkung zu steigern (19).

2.6.1. Adjuvantien

Adjuvantien sind Substanzen, die auf unspezifische Weise die immunogene Wirkung von Antigenen verstärken und somit bestimmte Abwehrfunktionen fördern können. (78).

Impfstoffe aus inaktivierten Erregern enthalten sowohl in monospezifischen als auch in Kombinationsvaccinen verschiedene Adjuvantien, die je nach Art unterschiedliche Aktivitäten stimulieren können: Steigerung der Antikörperbildung, Verstärkung der zellulären Immunmechanismen, Erhöhung der Phagozytoseleistung bezüglich Antigen-erkennung und- verarbeitung.

Nach A. Mayr sind die wichtigsten Adjuvantien: Adsorbentien (z.B. Aluminiumhydroxid, Aluminiumhydrogel) Mineral- und Pflanzenöle, Bestandteile und Extrakte aus grampositiven oder gramnegativen Bakterien, Polyanionen, Mitogene, Lipide und Substanzen deren immunmodulierende Wirkungen zufällig entdeckt wurden (z. B. Levamisol). Da alle diese Substanzen an der Impfstelle mehr oder weniger reizend oder im Körper systemisch toxisch wirken können, sollen Impfstoffe nur bei gesunden Individuen vorbeugend eingesetzt werden, um den Organismus nicht mehr als nötig zu belasten. Zahlreiche postvaccinale Schäden durch spät reagierende Allergien bei der MKS-Schutzimpfung führten zu der Erkenntnis, daß auch in der Tiermedizin in Zukunft nur noch gereinigte Impfstoffe auf den Markt kommen sollten. Parallel dazu entdeckte die Forschung, daß stärker gereinigte und konzentrierte Impfstoffe die Wirksamkeit stark verbessern können.

(53, 55).

1969 verglichen Tribe et al. monospezifische- und Kombinationsvaccinen aus den inaktivierten Virusarten Parainfluenza 3 (PI-3) und bovinem Adenovirus 3. Beide Impfstoffe bewirkten einen gleichen Antikörpertiteranstieg, aber eine kombinierte "Öl-Adjuvansvaccine" erzielte eine bessere PI-3-Antikörperantwort als ein "Aluminiumhydrogel" substituierter Impfstoff gleicher Zusammensetzung.

(87).

1972 stellten Kolar et al. fest, daß ein kombinierter Impfstoff aus inaktivierten Virusarten mit den Komponenten PI-3, IBR und BVD-MD mit Adjuvans höhere Antikörpertiter bewirkte als dieselbe Adjuvans-freie-Kombinationsvaccine.

(35).

Coulehan untersuchte 1983 die Immunogenität einer *Haemophilus-Influenza* Typ B-Vaccine in Verbindung mit einer Diphtherie-Keuchhusten-Starrkrampfpfimpfung bei Kindern. 37 Kinder einer Gruppe wurden mit DPT Vaccine (Diphtheria-Pertussis-Tetanus), kombiniert mit *Haemophilus-Influenza* Typ B und "polyribosyl-ribitol Phosphat" als Adjuvans geimpft. Die andere Gruppe mit 30 Kindern wurde nur mit der DPT-Vaccine geimpft. In der ersten Gruppe zeigten 63 %, hingegen in der zweiten nur 22 % eine ausreichende Immunantwort. (22).

Sehr wichtig ist der Zusatz geeigneter Adjuvantien zu den Kombinationsvaccinen zur Muttertier-Impfung mit dem Ziel einer verlängerten Antikörperausscheidung über die Milchdrüse (5).

Ein gezielteres Einwirken auf das unspezifische Abwehrsystem und damit auf die Antigen-Erkennung und -Verarbeitung ist mit einer neuen Gruppe von Immunmodulatoren, die von Mayr Paramunitätsinducer genannt wurden, möglich. (45, 46, 51, 57).

2.6.2. Paramunitätsinducer

Ausgehend von der "unspezifischen Eiweißtherapie" entdeckte die Wissenschaft viele Möglichkeiten der medikamentellen Steigerung der nichtantigenspezifischen, körpereigenen Abwehr. Eine Vielzahl von Begriffen, die im Zusammenhang mit der Stimulierung unspezifischer Abwehrvorgänge verwendet wurden, führten mehr zu Verwirrung als zur Klärung der Vorgänge im Organismus. A. Mayr faßte 1979 alle diese Bezeichnungen zusammen und postulierte den Begriff "Paramunisierung". Damit wurde eine einheitliche Begriffsbestimmung für all die Medikationen geschaffen, welche die nichtantigenspezifische Abwehr in einem Organismus erhöhen, Abwehrschwächen beseitigen und einem Individuum einen erhöhten unspezifischen Schutz (Paramunität) gegenüber einer Vielzahl ganz unterschiedlicher Noxen, Antigene, Toxine und Erreger vermitteln. (46, 51, 57).

Heute werden in der Tiermedizin fast ausschließlich biologische Inducer eingesetzt, da praxisreife chemische Inducer kaum vorhanden sind. Nach der Wirkung kann man multipotente und unipotente Inducer unterscheiden.

Unipotente Inducer stimulieren gezielt nur einzelne, für die nicht erregerspezifische Abwehr nötige Faktoren bzw. Mechanismen, z.B. die Interferonbildung oder Freisetzung bestimmter Mediatoren wie Interleukin 1 oder 2, die Aktivierung von Makrophagen, Lymphozyten etc. (75). Demgegenüber sind multipotente Paramunitätsinducer befähigt, mehrere dieser Mechanismen bzw. Reaktionen gleichzeitig zu aktivieren. Ihre Wirksamkeit ist umso größer, je mehr dieser Aktivitäten sie anzusprechen vermögen.

Trotz der noch nicht endgültig geklärten Wirkungsmechanismen für viele Immunmodulatoren, Adjuvantien und Paramunitätsinducer und der immer noch herrschenden Definitionsprobleme kann heute der Hoffnung Ausdruck gegeben werden, daß der Einsatz dieser Substanzen kombiniert mit Vaccineantigenen eine wesentliche Verbesserung der heutigen Impfstoffe bewirken kann.

Jüngstes Beispiel erfolgreicher Anwendung eines Paramunitätsinducers in Verbindung mit der aktiven Schutzimpfung ist die Bekämpfung der Rhinits atrophicans des Schweines, einer Erkrankung an deren wirksamer Prophylaxe durch Schutzimpfung seit langem mehr oder weniger erfolgreich gearbeitet wird (66).

Die Funktion eines Paramunitätsinducers kann in einigen Fällen durch eine für den Impfling homologe oder heterologe Antigenkomponente einer Kombinationsvaccine optimal erfüllt werden. Pocken- und Parapockenviren sind dafür sehr gut geeignet (45, 51).

Bei dem Ziel eine aktive Immunität zu stimulieren, können je nach vorwiegender Bedeutung humoraler oder zellulärer Abwehrleistungen entweder bevorzugt B Zell-stimulierende oder mehr T Zell-stimulierende Immunmodulatoren einer Vaccine zugesetzt werden (33, 70, 80). Ferner läßt sich z.B. die Aktivität der B Zellen auf dem Umweg über eine Reduktion der Suppressor-T Zellaktion steigern (80). Diese Möglichkeiten selektiver Beeinflußung der Reaktivität auf Antigene sowohl bei monospezifischen- wie auch bei Kombinationsvaccinen werden erst experimentell genutzt. In der Praxis weit verbreitet bleibt dagegen die Anwendung einer Vielzahl mehr durch Zufall entdeckter Adjuvantien (74).

2.7. Allgemeine Vor- und Nachteile der Impfprophylaxe mit Kombinationsvaccinen

Neben arbeits- und produktionstechnischen Erleichterungen (nur 1-2 Applikationen, nur 1 Abfüllung) sprechen aus medizinischer Sicht ein verminderter Behandlungsstress und damit herabgesetzte Verletzungs- und Erkrankungsgefahren für den Einsatz von Kombinationsvaccinen. Dies trifft hauptsächlich für die Kleintierpraxis zu, wo lange Impfintervalle und besondere Schonung der Impflinge wünschenswert sind (72).

Echte Weiterentwicklungen bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten wurden durch die funktionell-synergistischen Kombinationsvaccinen erzielt. Hiermit war erstmals eine sinnvolle Prophylaxe kompliziert ablaufender Mischinfektionen möglich. Zusammen mit anderen tierärztlichen und betriebshygienischen Maßnahmen kann mit diesen Kombinationsvaccinen auch gegen den gefürchteten (infektiösen) Hospitalismus vorgegangen werden (50). Numerisch-additive Kombinationsvaccinen geben zwar die Möglichkeit oft eine Vielzahl "klassischer" Infektionskrankheiten mühelos, billig und wirksam zu bekämpfen, sie sind aber nicht auf das Milieu der Impflinge abgestimmt.

Nachteilig kann sich bei numerisch-additiven Kombinationsvaccinen eine Erregerkombination ohne ausreichende Austestung eventuell antagonistischer Beeinflussung der Impfstoffkomponenten auswirken. Dies betrifft insbesondere die "gemischten Kombinationsvaccinen" aus inaktivierten und vermehrungsfähigen, attenuierten Erregern.

Große Vorsicht ist auch bei den Inaktivierungsmethoden und eventuellen Inaktivierungsmittel-Rückständen sowie der Wahl entsprechender Adjuvantien für die überwiegende Zahl an Kombinationsvaccinen aus inaktivierten Erregern geboten. Hier leisten entsprechende Laborteste an Zellkulturen (Toxizität) und geeigneten Versuchstieren (Allergisierung) gute Vorarbeit für den praktischen Einsatz.

Für die Praxis ist die Feststellung des Gesundheitszustandes eines Impflings oder einer zu impfenden Population bei beabsichtigtem Einsatz einer Kombinationsvaccine von besonderer Bedeutung. Es werden in der Mehrzahl Kombinationsvaccinen aus inaktivierten Erregern eingesetzt, die i.d.R. Adjuvantien und oftmals Inaktivierungsmittel-Rückstände enthalten, die eine besonders große Impfbelastung der Tiere verursachen. Aus diesem Grund sind Notimpfungen wie bei monospezifischen Vaccinen auch nur mit Kombinationsvaccinen aus ausschließlich attenuierten Erregern ratsam.

Schließlich sollte auch für den Einsatz von Kombinationsvaccinen ein ausgewogener Impfkalender berücksichtigt werden, um einmal Interaktionen mit maternalen Antikörpern bei neonatalen Erstimpfungen zu umgehen und zum anderen die optimale Immunitätsbildung zur Zeit der höchsten Infektionsgefährdung zu erreichen.

(4, 48).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Impfstoff

Alle Untersuchungen wurden mit einem Kombinationsimpfstoff durchgeführt, der BVD/MD-Virus (Stamm "Oregon C 24 V") und Orfvirus (Stamm "D 1701") in vermehrungsfähiger Form enthält. Es handelt sich dabei um einen Versuchsimpfstoff, der vom Bayer. Innenministerium für Feldversuche in Bayern zugelassen worden ist. Der Impfstoff lag in lyophilisierter Form, in 2 ml-Ampullen vor. Vor der Verwendung wurde der Inhalt der Ampullen in jeweils 2 ml Aqua dest. steril und pyrogenfrei gelöst.

Die vorliegenden Impfversuche wurden mit der Charge G 003 durchgeführt. Die Gesamtcharge bestand aus 472 Ampullen die bis zur Verwendung wurde sie im Kühlschrank bei ca. + 4° C gelagert.

3.1.2. Tiermaterial

3.1.2.1. Kleine Versuchstiere (Maus, Kaninchen)

Zur Prüfung der Unschädlichkeit und der paramunisierenden Wirksamkeit der Kombinationsvaccine wurden NMRI-Babymäuse im Alter von 3 Tagen und adulte weibliche NMRI-Albinomäuse 18-20 g schwer, bezogen von der Versuchstierzucht Ivanovas (Kißlegg, Allgäu), verwendet. Um einheitliche Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden die Babymäuse der verschiedenen Würfe gleichmäßig auf die vorhandenen Muttertiere aufgeteilt. Versuchs- und Kontrollgruppen enthielten auf diese Weise die gleiche Mischung von Babymäusen aller Würfe. Die immunisierende Wirksamkeit der BVD/MD-Komponente wurde mit ausgewachsenen Chinchilla-Bastard Kaninchen (Ivanovas, Kißlegg, Allgäu) geprüft.

3.1.2.2. Rind (Art der Impfbestände)

Eine Impfung mit der Kombinationsvaccine Charge G 003 wurde an 2 serologisch BVD/MD antikörperfreien, institutseigenen, 3 Monate alten männlichen Kälbern der Rasse Höhenfleckvieh, und 2 erwachsenen Schafen (Merinolandschaf) mit gleichem Immunstatus, sowie als Feldversuch in insgesamt 10 Betrieben an 237 Mastrindern vorgenommen. Da während des Ablaufes der Feldversuche in 2 Betrieben ein Ausbruch der infektiösen bovinen Rhinotracheitis (IBR) klinisch und virologisch diagnostiziert wurde, wurden Versuchsergebnisse aus diesen Betrieben nicht ausgewertet.

Bei den verbliebenen Betrieben handelt es sich um Bullenmäster, die Saugkälber zukaufen, um sogenannte "Fressererzeuger" oder um Kälbermäster.

Die Betriebe liegen in Niederbayern, im Allgäu, im bayerischen Schwaben oder im schwäbisch Baden-Württembergischen Grenzgebiet.

Die Bestandsgröße der Kälbermast-Betriebe ("Fressererzeuger") schwankt zwischen 100-250 Stück Vieh. Die Bullenmäster haben pro Mastperiode zwischen 100 und 350 Tiere aufgestellt. Bei jeder neuen Aufstallung werden 10-35 Saugkälber im Alter von 2-4 Wochen zugekauft. Der Zukauf erfolgt vorwiegend auf Märkten und nur im Ausnahmefall von privaten Erzeugern. Zu 90 % werden in den erwähnten Betrieben Deutsches Höhenfleckvieh oder Deutsches Braunvieh aufgestellt. Die restlichen 10 % der Jungtiere werden meist aus Frankreich importiert. Es handelt sich vorwiegend um die Rassen Charolais und Limousin.

In den folgenden Betrieben wurden Impfversuche durchgeführt. Die Impfung erfolgte jeweils am 2. oder 3. Tag nach der Aufstallung.

1. Betrieb: G.E.

Impfversuche am 30.06.1982 Tierzahl: 19

und am 08.09.1982 Tierzahl: 20

Während der letzten 3 Mastdurchgänge vor dem Impfversuch traten bei 60 aufgestellten Kälbern folgende Schäden auf:

Morbidität

25

Mortalität

10

Es handelt sich um einen 15 ha großen Fressererzeugerbetrieb, der pro Mastperiode bis zu 150 Kälber aufstellt. Der Zukauf von 2-4 Wochen alten Fleckvieh-Saugkälbern erfolgt je nach Marktlage alle 3 Wochen. Bei schlechter Marktlage weicht der Betrieb vermehrt auf Ferkelhaltung aus. Die Haltungsbedingungen in den alten Stallungen, in denen früher Schweinemast betrieben wurde sind denkbar schlecht. Die Rinder werden in 4 alten Stallabteilungen nach der "Rein-Raus-Methode"

aufgestellt. Die Kälber werden während der ersten 4 Aufzuchtwochen in einem Tieflaufstall auf Stroh gehalten, dann stehen sie auf Spalten. Insbesondere ist die Lüftung als "schlecht" zu bewerten. Da die Fütterung mit Milchaustauscher über Milchautomaten erfolgt, werden erkrankte Tiere relativ spät erkannt. Der Besitzer kennt die Problematik seines Betriebes, will aber aus finanziellen Gründen keine "Neuerungen" einführen.

2. Betrieb: H.F.

Impfversuche am 11.08.1982 Tierzahl: 15

und am 15.09.1982 Tierzahl: 22

Während der letzten 3 Mastdurchgänge vor Versuchsbeginn traten bei 100 aufgestellten Kälbern folgende Schäden auf:

Morbidität

78

Mortalität

25

In diesem 50 ha großen Betrieb werden 250 - 300 Bullen gehalten. Im allgemeinen werden alle 10 Wochen 25 - 40 Fleckvieh-Saugkälber, Charolais oder Limousin zugekauft. Fresser werden statt Saugkälbern nur erworben, wenn im Bestand gesundheitliche Probleme auftreten. Die neugekauften Kälber kommen in einen eigenen Tieflaufstall, wo sie auf Stroh 8 - 10 Wochen gehalten werden. Nach dieser Zeit kommen die Tiere in Laufboxen, wo sie auf Spalten stehen. Die Tränke mit Milchaustauscher erfolgt über Eimer zweimal täglich.

Der Betrieb ist ein moderner Aussiedlerhof mit guter Lüftung und zufriedenstellenden hygienischen Bedingungen. Der Betrieb war zur Zeit der Betreuungs-Übernahme als Problembetrieb mit hohem Medikamenteneinsatz einzustufen. Bei den letzten 3 Aufstellungen starben von 100 Tieren immerhin 25 Tiere aus nicht mehr genau feststellbaren Gründen.

3. Betrieb: K.F.

Ein Impfversuch am 14.10.1982 Tierzahl: 25

Während der letzten 3 Mastdurchgänge vor der Versuchsimpfung traten bei 90 aufgestellten Kälbern folgende Schäden auf:

Morbidität

7

Mortalität

1

In diesem 24 ha großen Betrieb werden neben Milchvieh noch etwa 150 Bullen gehalten. Etwa alle 3 Monate werden 25 - 30 Saugkälber zugekauft. Die Kälber werden in einem eigenen Aufzucht-Stall auf Stroh nach der Rein-Raus-Methode aufgestellt. Später kommen sie in Laufboxen und stehen auf Spalten. Die Kälber werden zweimal täglich aus Tränkeemern mit Milchaustauscher getränkt. Die Lüftungs- und Hygiene-Bedingungen sind gut. Da früher 2 Tiere anlässlich einer Sektion pathologisch-anatomisch BVD-MD-Symptome zeigten, ließ der Besitzer während der letzten 3 Einstellungen mit der Vaccine Pneumovac plus^R (einer Kombinationsvaccine gegen Rinder Grippe, BVD/MD und IBR) impfen. Nach dieser Einstellungsprophylaxe und dem Einsatz von Medizinalfutter traten keinerlei Erkrankungen mit BVD-MD-Symptomen auf.

4. Betrieb: K.A.

Eine Versuchsimpfung am 08.09.1982 Tierzahl: 20

Mit 12 ha gehört dieser Betrieb zu den kleinen Höfen. Vater und Sohn teilen sich die Arbeit an 250 Tieren. Wöchentlich werden etwa 20 Braunvieh-Kälber vom Händler gekauft. Sie werden in hölzernen Kälberboxen angebunden. Die Milchaustauscher-Fütterung erfolgt zweimal täglich über Tränkeimer. Die Kälber stehen in 3 abgetrennten größeren Einheiten. Während die Pflege der Tiere einen guten Eindruck hinterläßt, verursachen die hohe Belegdichte, die niedrigen Räume und eine ungenügend regelbare Belüftung ein schlechtes Raumklima. Lungen-Spitzenlappenverwachsungen sind ein häufiger Schlachtfund.

5. Betrieb: L.A.

Eine Versuchsimpfung am 11.08.1982 Tierzahl: 20

Während der letzten 3 Mastdurchgänge vor der Versuchsimpfung traten bei 30 aufgestellten Tieren folgende Schäden auf:

Morbidität

5

Mortalität

1

Seit über 20 Jahren wird in diesem Betrieb Kälbermast gewerblich betrieben. Je nach Gesundheitszustand und Marktlage erfolgt der Zukauf wöchentlich. Es können bis zu 180 Kälber aufgestellt werden. Im allgemeinen werden weniger Tiere gehalten. Die Kälber sind in Holzkäfigen angebunden. Der Betrieb verfügt aber auch über einen kleinen Stroh-Tieflaufstall in dem kranke und rekonvaleszente Tiere separiert werden. Die Tränke erfolgt über Eimer zweimal täglich. Obwohl Erkrankungen des Respirationstraktes oft auftreten, müssen Lüftung und Hygiene mit hervorragend bewertet werden.

6. Betrieb: K.L.

2 Impfversuche am 13.07.1982 Tierzahl: 17

und am 15.09.1982 Tierzahl: 35

Während der letzten 3 Mastdurchgänge vor den Versuchsimpfungen traten bei 105 aufgestellten Tieren folgende Schäden auf:

Morbidität

25

Mortalität

9

Dieser im Allgäu gelegene, 100 ha große Betrieb gehört zu einem Kloster, das ein Altersheim versorgt. Das Klostergut hilft die Betriebskosten niedrig zu halten. Es werden 300 - 350 Bullen gehalten, man ist derzeit im Begriff, auf 500 Tiere aufzustoßen.

Etwa alle 2 Monate werden 35 Saugkälber zugekauft. Fresser werden statt Saugkälbern nur dann erworben, wenn im Betrieb gesundheitliche Probleme auftreten. Die 35 Tiere werden nach "Rein-Raus"-Methode auf Stroh aufgestellt. Nach 8 Wochen kommen die Tiere gruppenweise auf Spalten. Im allgemeinen hat der Betrieb während der Aufzuchtphase weniger Probleme als während der Mastperiode. Lungenentzündungen und Panaritien verursachen der Betriebstechnik die größten Probleme.

7. Betrieb: S.J.

2 Versuchsimpfungen am 30.06.1982 Tierzahl: 19

und am 29.09.1982 Tierzahl: 11

Während der letzten 3 Mastdurchgänge vor den Impfversuchen traten bei 30 aufgestellten Tieren folgende Schäden auf:

Morbidität

39

Mortalität

28

Hier handelt es sich um einen Milchvieh-Betrieb mit einer Flächengröße von 12 ha. Ein Kälber-Maststall mit 120 Liegeplätzen wurde ausgesiedelt. Nahezu jede Woche werden 10 - 20 Kälber neu aufgestellt, die von privat, vom Händler und auf Auktionen zugekauft werden. Alle Tiere werden in einem Gesamtstall, angebunden gehalten. "Rein-Raus"-Methode ist nicht möglich. Alle Tiere stehen auf Betonspalten. Die Tiere werden zweimal täglich mit Milchaustauscher aus Eimern getränkt. Der Tierbesitzer ist Junggeselle und muß alle Stallarbeiten selbst machen. Durch hohe Räume und eine groß dimensionierte Zu- und Abluftregulation macht die Lüftung einen guten Eindruck. Falscher Stallbau, Nachlässigkeit des Besitzers und schlechte Hygienebedingungen ließen eine wirtschaftliche Kälbermast bisher nicht zu.

8. Betrieb: V.P.

Ein Impfversuch am 27.10.1982 Tierzahl: 14

Während der letzten 3 Mastdurchgänge vor Versuchsbeginn traten bei 38 aufgestellten Tieren folgende Schäden auf:

Morbidität

16

Mortalität

5

Der 25 ha große Betrieb wird als "Fressererzeuger" bezeichnet, der derzeit 100 Standplätze hat. Nahezu jeden Monat werden ca. 10 - 20 Kälber zugekauft. Etwa 20 Tiere können auf Stroh gehalten werden. Die übrigen 80 Kälber stehen auf Betonspalten. Die Tiere werden nach der "Rein-Raus"-Methode aufgestellt. Die Milchaustauscher-Tränke erfolgt zweimal täglich über Eimer. Lüftung und Hygiene sind gut. Der Betrieb ist ein Stadtbauernbetrieb, der auf die "Fressererzeuger" nicht angewiesen ist.

Unter den 8 Versuchsbetrieben befinden sich 3 BVD/MD-Problembetriebe (G.E., H.F., S.J.). Bei 36 Einstellungen vor Versuchsbeginn wurden 483 Tiere aufgestellt. Nach Angaben der Besitzer traten dabei 80 Todesfälle auf. Alle 80 Tiere verendeten mit bronchopneumonischen und/oder enterischen Krankheitserscheinungen. Nur ein Landwirt (K.L.) ließ die verendeten Tiere untersuchen und konnte so den Nachweis erbringen, daß 9 Tiere an BVD/MD-Erkrankung gestorben waren.

Zwei Betriebe hatten schon vor Versuchsbeginn gegen BVD/MD impfen lassen. Dabei zeigten im Betrieb K.L. von 35 Impfungen immerhin 30 nach der Impfung, mit einem dem Besitzer unbekannten Impfstoff, Lungenaffekte. 6 Tiere starben (unbekannte Diagnose) und 10 kümmerten nach der Genesung (Tab. 7).

Im anderen Betrieb (G.E.) starb nach der Impfung mit Pneumovac plus ^R einer von 20 Impfungen; Kümmerer traten nicht auf.

Eine Aufstellungsprohylaxe wurde in allen Betrieben durchgeführt (Tab. 6).

Vorbeugende "Rindergrappe"-Schutzimpfung, Einsatz von Medizinalfutter und in einem Fall Paramunitätsinducer (BSK-Kolb) waren nicht in der Lage, die oben erwähnten Schäden zu verhindern.

3.1.3. Prüfung der Unschädlichkeit

Für die Untersuchung auf Unschädlichkeit wurden stichprobenartig 10 Fläschchen der lyophilisierten Impfstoffcharge entnommen und nach Anweisung in Aqua dest. gelöst.

3.1.3.1. Kleine Versuchstiere

Die frisch hergestellte Suspension ist an 15 adulte und 30 Babymäuse verimpft worden. 5 NMRI-Mäuse (weibl., 20 g schwer) erhielten 0,05 ml der Vaccine intracerebral und 10 NMRI-Mäuse (weibl., 20 g schwer) 0,5 ml der Vaccine intraperitoneal appliziert. Ferner wurden 30, drei Tage alten NMRI-Babymäusen 0,1 ml subcutan gespritzt. Die Tiere wurden 14 Tage lang täglich hinsichtlich klinischer Symptome überwacht.

3.1.3.2. Rind, Schaf

Um die Unschädlichkeit der Vaccine unter erschwerten Bedingungen zu prüfen, erhielten jeweils 2 Kälber und 2 Schafe, die keine humoralen Antikörper gegen das ORF- und BVD-Virus aufwiesen, die dreifache Impfdosis, also 6,0 ml, intramuskulär appliziert. Diese Tiere wurden in institutseigenen Stallungen 2 Monate lang klinisch überwacht. Bei den Kälbern wurden die ersten 4 Tage post vaccinationem Leukocytenzählungen durchgeführt, sowie nach 1, 2, 3 und 4 Wochen das Serum auf BVD-virusneutralisierende Antikörper untersucht (siehe Tab. 1, 3).

3.1.4. Prüfung der immunisierenden Wirksamkeit

3.1.4.1. Mikroneutralisationstest mit BVD/MD-Virus

Die Wirksamkeit der Vaccine wurde nach Feststellen ihrer Unschädlichkeit in oben genannten Prüfverfahren in einem Feldversuch in bayerischen Mastbetrieben geprüft.

a) Kaninchen

Zuvor wurde der Kombinationsimpfstoff einem Wirksamkeitstest an kleinen Labor-tieren unterzogen. 2,0 ml der Vaccine wurden intramuskulär ausgewachsenen Chinchilla-Bastard-Kaninchen im Abstand von 14 Tagen zweimal appliziert, und die Seren der durch Herzpunktion gewonnenen Blutproben der Tiere im Labor mit dem Mikro-Neutralisationstest auf Antikörper gegen das BVD/MD-Impfvirus untersucht. Es standen Kaninchen-Seren vor der Impfung, 14 Tage post Primovaccinationem und 14 Tage nach der Boosterimpfung zur Antikörperbestimmung zur Verfügung.

b) Rind

Die Serumgewinnung erfolgte analog der Rinderserumgewinnung aus den Blutproben der Feldversuche (siehe Abschn. 3.1.6.2.)

Vor Testbeginn wurden die entsprechenden Seren 30 Min. lang bei 56⁰ C im Wasserbad inaktiviert.

Der Antikörper-Nachweis erfolgte durch Serumtitration im Mikroneutralisationstest gegen ca. 100 KID/50 des Impfvirus, Stamm Oregon C 24 V (21).

Dazu wurden Serumverdünnungen in 2er Potenzen in 4 identischen Ansatzreihen in Mikrotiterplatten (Falcon 3040, Becton Dickinson Labware) mit Zellanzuchtmedium serienmäßig bis zur Verdünnung 1:1024 angelegt. (Labpipette, Firma Flow Laboratories GmbH).

Als Indikatorzellen wurden sekundäre bovine fetale Lungenzellen (BEL), gewonnen nach der üblichen Trypsiniertechnik aus den Lungen 5-6 Monate alter Rinderfeten (Schlachthof, München), mit einer Zelleinsaat von 200000/Plattenvertiefung (0,2 ml) benutzt (56).

In jedem Test wurden Zellkontrollen aus bovinen fetalen Lungenzellen (BEL) und Viruskontrollen mitgeführt, ebenso ein Rinderserum mit bekanntem Antikörpergehalt (Titer 1:128). Die Berechnung der Neutralisationstiter der Seren erfolgte nach der Methode von Kärber (30).

Die Endablesung und Auswertung des Tests wurde immer am 7. Tag nach Testansatz vorgenommen.

3.1.4.2. Intracutantest mit Parapoxvirus

In einem Betrieb (H.) wurde an 16 Junggrindern, die im Alter von 2 Wochen mit der Kombinationsvaccine geimpft worden waren, 3 Wochen p.vacc. ein Intracutantest nach dem Verfahren des Tuberkulintestes vorgenommen (14). Hierfür wurde das Parapox-Antigen aus der Kombinationsvaccine unverdünnt ($= 10^7$ KID/50/0,1 ml) u. 1:10 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt im Abstand von 15 cm in die Haut der geschorenen und gut gereinigten rechten Schulterfläche in einem Volumen von 0,1 ml injiziert.

Die Haut wurde nach 4-, 8- und 16-Stunden sowie 3 Tage nach der Antigenapplikation an den Injektionsstellen auf Rötung, Umfangsvermehrung, Konsistenz, Schmerzempfindlichkeit und nekrotische Veränderungen sowie peripher auf Reaktionen regionaler Lymphknoten und -gefäße untersucht.

Ferner wurden am Tag der Impfung in jedem Betrieb bis zu 6 Stunden post vacc. die Impflinge hinsichtlich des Auftretens allergischer Reaktionen vom Soforttyp klinisch überwacht. Während der gesamten Versuchsdauer wurden alle gesundheitlichen und betriebshygienischen Daten sowie der Gesundheitsstatus der Impflinge durch wöchentliche klinische Überwachung erfaßt.

3.1.5. Nachweis der paraspezifischen Wirkung

Die Kombinationsvaccine wurde auf ihren Einfluß auf unspezifische Abwehrfunktionen in zwei Mäuse-Belastungsmodellen geprüft (13, 75).

3.1.5.1. VSV-Infektionsmodell mit Babymäusen

Die hohe Empfänglichkeit der Babymaus für einen an die Maus adaptierten Stomatitis Vesikularis-Virus-Stamm (VSV) ist die Grundlage einer empfindlichen Screening-Methode zur Wirksamkeitsbestimmung von Paramunitätsinducern. In diesem Modell wurden je 30 NMRI-Babymäuse (1 Gruppe), gleichen Alters (2-3 Tage) jeweils mit der Kombinationsvaccine, ihren Einzelkomponenten sowie einer handelsüblichen BVD/MD Vaccine mit 0,1 ml subcutan vorbehandelt und 16-24^h später mit 50-100 LD₅₀ des hochvirulenten Stomatitis Vesikularis-Virus intraperitoneal belastet. (VSV, Rhabdoviridae: 17. Kulturpassage auf Hühnerembryofibroblasten-Zellen, Titer 10^{7,25} TCID₅₀/ml).

Die Mortalität der bei den Muttertieren belassenen Babymäusen wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen ausgewertet. Unter Berücksichtigung der Mortalität bei einer aus gleicher Tierzahl bestehender, mit virusfreiem Zellkulturmedium vorbehandelter, und identisch VSV-belasteter Tiergruppe, wurde der Wirkungsindex nach der Formel von Raettig errechnet (13).

$$\text{Wirkungsindex} = b - a : b \times 100$$

b = % Mortalität Kontrolle

a = % Mortalität Versuchsgruppe

3.1.5.2. Aujeszky-Infektionsmodell mit adulten Mäusen

Dieses Mäuse-Belastungsmodell zur Wirksamkeitsprüfung von Paramunitätsinducern beinhaltet die Vorbehandlung von je 20 adulten NMRI-Mäusen (weibl. ca. 20 g schwer) mit 0,2 ml der zu prüfenden Substanzen intraperitoneal und 16-24^h später die Belastung dieser Mäuse mit 50 - 100 LD/50 des Aujeszky-Virus ebenfalls intraperitoneal. Als Belastungsvirus wurde Aujeszky-Virus (Herpesviridae), Stamm Hannover, als 23. Rinderlungen-Zellkultur-Passage mit einem Titer von $10^{8,0}$ KID/50/ml eingesetzt. Als Kontrolle wurde eine entsprechende Tierzahl mit virus-freiem Zellkulturmedium (0,2 ml) intraperitoneal vorbehandelt und entsprechend mit Aujeszky-Virus belastet.

Die Tiere wurden 14 Tage lang nach der Belastung beobachtet. In diesem Zeitraum wurde die Mortalität in den Versuchsgruppen und in den Kontrollgruppen ermittelt. Die höchste Morbidität (akuter Infektionsverlauf) und Mortalität (subakuter Infektionsverlauf) trat zwischen dem 3. und 6. Tag post infectionem auf. Da die akute Erkrankung ebenfalls immer zum Tode führte, wurden Tiere mit akuten Krankheitssymptomen schmerzlos getötet.

Wie im VSV-Modell wurde auch hier die Vaccine, ihre Einzelkomponenten und eine handelsübliche BVD/MD-Vaccine auf ihren Einfluß auf unspezifische Abwehrleistungen geprüft. Die Auswertung erfolgte wiederum unter Berechnung des Schutzindex nach der Formel von Raettig.

3.1.6. Feldversuche

3.1.6.1. Impfmodus

Die BVD/MD-ORF Kombinationsvaccine Charge G 003 wurde bei allen Rindern in einem Volumen von 2,0 ml intramuskulär in den M. triceps brachii injiziert. Es wurde darauf geachtet, bei jedem Tier etwa an gleicher Stelle die Injektion vorzunehmen, um an der Injektionsstelle eine bessere klinische Überwachung zu garantieren. Alle Mastkälber aus dem Feldversuch wurden einmal im Alter von 2 - 4 Wochen am 2. oder 3. Tage nach der Aufstallung geimpft. Die inoculierte Virusmenge pro Rind entspricht $10^{7,5}$ GKID/50 (=Gewebekultur infektiöse Dosis) für das BVD/MD-Impfvirus und $10^{7,0}$ GKID/50 für das Parapox-Impfvirus.

3.1.6.2. Probenentnahme

Bei jedem Impfling wurden 2 Blutproben aus der Vena jugularis unter sterilen Kautelen in Plastik-Zentrifugenröhrchen entnommen; die erste Probe unmittelbar vor der Impfung, die zweite Probe 3 Wochen nach der Impfung. Sofort nach der ersten Blutentnahme wurden die Tiere mit 2,0 ml der BVD/ORF-Kombinationsvaccine intramuskulär geimpft. Die Serumgewinnung für den Nachweis BVD/MD-virusneutralisierender Antikörper erfolgte durch einmaliges Zentrifugieren der Blutproben bei 3000 U/min., 10 Minuten lang und erneutes Zentrifugieren des überstehenden Serums 5 Minuten lang bei gleicher Umdrehungszahl (Varifuge, Heraeus Christ, Osterode). Der Antikörpertiter wurde schließlich in diesem erythrozytenfreien, klaren Serum bestimmt. Die Lagerung der Seren bis zur Durchführung des Neutralisationstests wurde bei -20°C vorgenommen.

Als Stichproben wurden von 15, eine Woche vor der Impfung serologisch im Mikro-Neutralisationstest gegen BVD/MD-Virus negativ reagierende Mastkälber aus dem Betrieb H.F. an den Tagen 1, 2 und 4 nach der Impfung Blutproben in heparinbeschichteten Kunststoff-Röhrchen (NH_4 Heparinat, Firma Sarstedt, Nümbrecht) aus der Vena jugularis zur Leukozytenzählung entnommen.

3.1.6.3. Klinische Beobachtung

Die geimpften Mastkälber wurden in allen Betrieben während der ersten Woche nach der Impfung täglich palpatorisch und durch Adspektion an der Injektionsstelle untersucht.

Im Feldversuch wurden die geimpften Rinder eine Woche lang post vaccinationem täglich auf lokale und allgemeine klinische Reaktionen untersucht. Ferner wurden stichprobeweise 6 - 24 Std. nach der Impfung Temperaturmessungen vorgenommen. Alle Versuchsbetriebe wurden bezüglich des Gesundheitszustandes der aufgestellten geimpften und ungeimpften Mastrinder, besonders hinsichtlich BVD-MD-Symptome streng tierärztlich überwacht.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Nachweis der Unschädlichkeit

Während der 14 tägigen Beobachtungszeit traten bei allen mit dem Vaccinepool (Originalampullen) inoculierten Mäusen keine allgemeinen klinischen Symptome und keinerlei pathologisch-anatomische Veränderungen am Injektionsort auf. Dasselbe wurde bei den 4 intramuskulär geimpften Kaninchen festgestellt. Bei den mit einer dreifachen Impfdosis intramuskulär injizierten Kälbern und Schafen konnten ebenfalls weder lokal noch allgemein klinische Reaktionen beobachtet werden. Die Körpertemperatur beider Kälber lag über den gesamten Beobachtungszeitraum (6 Wochen) im physiologischen Bereich. An den genannten Tagen post vaccinationem blieb die Zahl der Leukozyten der zwei institutseigenen wie auch der 15 seronegativen Kälber aus den Feldversuchen im physiologischen Normbereich (siehe Tabelle 1). Der Verlauf der Antikörperbildung bei den mit einer Überdosis geimpften institutseigenen Kälbern ist aus Tabelle 3 ersichtlich. Die zwei unter kontrollierten Bedingungen im Isolierstall gehaltenen, seronegativen Kälbern, reagierten auf die dreifache Antigenmenge der Kombinationsvaccine mit etwa gleich hoher BVD-neutralisierender Antikörperbildung wie die im Feldversuch mit einfacher Impfdosis vaccinierten, gleichaltrigen Mastkälber. Bei den im Feldversuch geimpften Mastrindern konnten in der Woche nach der Impfung weder allgemeine noch lokale auf die Impfung zurückzuführende klinische Reaktionen festgestellt werden.

Die bei insgesamt 40 Tieren als Stichproben durchgeführten Temperaturmessungen ergaben keine Werte im febrilen Bereich.

3.2.2. Immunisierende Wirksamkeit

3.2.2.1. Kleine Versuchstiere

Die im Labor durchgeführten Wirksamkeitsprüfungen an Kaninchen wurden mittels Antikörper-Titerbestimmung gegen das BVD-MD-Impfvirus im Mikroneutralisationstest ausgewertet, und sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Von 4 Kaninchen bildeten 3 Tiere schon 2 Wochen nach der Erstimpfung mit der BVD/ORF-Kombinationsvaccine neutralisierende Antikörper gegen das BVD-MD-Impfvirus. Dabei wurde im Serum von Tier Nr. 4 ein hoher Antikörpertiter nachgewiesen. Zwei Wochen nach der Boosterimpfung hatten alle vier Kaninchen z.T. hohe Titer (Tier 1 u. 4) an BVD/MID-neutralisierenden Antikörpern ausgebildet (s.Tab 2). Auch hier konnte bereits 14 Tage p.vacc. ein Titeranstieg beobachtet werden, der sich im Verlauf der nächsten Wochen weiter verstärkte.

Tabelle 1

Leukozytenzahlen/min³ Vollblut bei seronegativen Kälbern nach der Impfung mit
BVD/ORF Kombinationsvaccine G 003

<u>Tier Nr.</u>	<u>1. Tag p.vacc.</u>	<u>2. Tag p.vacc.</u>	<u>4. Tag p.vacc.</u>
1	8000	10300	8300
2	8500	8200	7800
3	6300	6800	6300
4	9400	7500	7200
10	10100	6800	6000
15	7600	6600	6000
17	11825	4900	6750
5	6800	6400	6700
6	13800	9500	9900
7	6300	6000	6100
8	8000	7200	8800
9	11800	10100	11300
11	7700	6000	6100
12	8000	9800	9400
13	10100	7800	7000

Institutseigene Tiere
(dreifache Impfdosis)

8300	7100	7100
6500	9600	9600

Tabelle 2

Bildung neutralisierender Antikörper gegen BVD-MD-Virus im Kaninchen nach der Impfung mit der BVD/ORF-Kombinationsvaccine.

Tier Nr.	Serumtiter -log 2 (Serumverdünnung)		
	vor der Impfung	am 14. Tag p.vacc.	am 20. Tag p.vacc. (14. Tag nach Booster)
1	≤ 1,5 (1:2)	3,75 (1:15)	5,0 (1: 32)
2	≤ 1,5 (1:2)	2,25 (1:5)	3,25 (1:10)
3	≤ 1,5 (1:2)	= 1,5 (1:2)	4,0 (1:16)
4	≤ 1,5 (1:2)	6,25 (1:76)	7,0 (1:128)

Tabelle 3

Entwicklung neutralisierender Antikörper gegen BVD/MD-Virus bei 2 Kälbern, nach Applikation der 3-fachen Impfdosis der BVD/ORF-Kombinationsvaccine.

Kalb	Serumtiter -log 2 (Serumverdünnung)				
	vor der Impfung	1 Woche p. vacc.	2 Wochen p.vacc.	3 Wochen p.vacc.	4 Wochen p.vacc.
K 5	≤ 1,5	4,2 (1:18)	4,8 (1:27)	5,75 (1:53)	5,8 (1:56)
K 9	≤ 1,5	3,5 (1:11)	4,25 (1:19)	6,0 (1:64)	6,0 (1:64)

3.2.2.2. Mastkälber im Feldversuch

Mikroneutralisationstest zum Nachweis von BVD/MD-Antikörpern

Der Wirksamkeitsnachweis im Feldversuch über die Bildung virusneutralisierender Antikörper gegen das BVD/MD-Impfvirus wurde durch Serumantikörper-Titer-Bestimmungen geführt (siehe 3.1.5.). Der Antikörperstatus der Mastrinder aus den Versuchsbetrieben, vor und 3 Wochen nach der Impfung, ist unter Einteilung der Tiere in 3 Reagenten-Gruppen in der Tabelle 5 aufgeführt.

Unter Berücksichtigung der vorgenommenen Einteilung in Reagentengruppen läßt sich die Bildung impfvirusneutralisierender Antikörper bei allen geimpften Masttieren, wie aus der Tabelle 4 ersichtlich, analysieren. Alle vor der Impfung als "seronegativ" zu bewertenden Tiere reagierten mit einer Antikörperbildung deren als Mittelwert errechneter Titer bei einer Serumverdünnung von 1 : 128 lag. Unter den Mastrindern, deren Antikörperstatus vor der Impfung als gering (1:2 - 1:10) eingestuft wurde, reagierte lediglich ein Tier nicht mit einem Titeranstieg auf die Impfung (Tabelle 5). Der mittlere Titer neutralisierender Antikörper aller übrigen Tiere dieser Gruppe lag ebenfalls wieder bei 1:128 (Tabelle 5) der Serumverdünnung. In die dritte Reagentengruppe wurden die Tiere mit relativ hohen Ausgangstitern an BVD/MD-Impfvirus-neutralisierenden Antikörpern eingeteilt (Titer 1:10). Der mittlere Antikörpertiter dieser Tiergruppe (n= 146) lag vor der Impfung bei der Serumverdünnung 1:64. Ein Anstieg des mittleren neutralisierenden Antikörpertiters 3 Wochen nach der Impfung mit der Kombinationsvaccine war hier nicht feststellbar. Es kam im Schnitt sogar zu einem leichten Abfall des Titer-Mittelwertes auf 1:54, wobei von 146 Individuen nur 43 postvaccinal mit einem höheren Serum-Antikörperspiegel angetroffen wurden (Tab. 4). 68 % der Tiere dieser Gruppe besaßen nach der aktiven Impfung mit der BVD/ORF-Kombinationsvaccine keine höheren Spiegel an neutralisierenden Antikörpern im peripheren Blut als prävaccinal vorhanden waren.

Tabelle 4

Neutralisierende Antikörper gegen BVD-Impfvirus in 8 Kälbermastbeständen vor und nach der Impfung mit der BVD/ORF-Vaccine

Bestand	Tiere mit niedrigem oder negativem Antikörperstatus vor der Impfung		Tiere mit BVD/MD-Antikörpern vor der Impfung	
	Zahl	positiv 3 Wochen p.vacc.	Zahl	Titeranstieg 3 Wochen p.vacc.
G.E.	20	20	17	1
H.F.	9	9	30	17
K.F.	12	12	13	2
K.A.	4	4	16	5
L.A.	8	7	12	2
K.L.	20	20	32	12
S.J.	13	13	17	3
V.P.	5	5	9	1
Summe	91	90	146	43

Tabelle 5

Vergleichende Darstellung der Antikörperbildung bei 237 Kälbern nach der Impfung mit der BVD/ORF-Kombinationsvaccine.

Antikörper Status vor der Impfung (Reagenten- gruppen)	prä vacc.		post vacc.		
	Anzahl der Impflinge	Mittlere Antikörper- Titer	Anzahl der Reagenten ohne Titer- anstieg	mit Titer- anstieg	Mittlere Antikörper Titer
Gruppe I negativ ≤ 1,5 (1:2)	69	1,5 (1:2)	0	69	7,0 (1:128)
Gruppe II 1,5 ≤ 3,25 (1:2 - 1:10)	22	2,5 (1:6)	1	21	7,0 (1:128)
Gruppe III > 3,25 (1:10)	146	6,0 (1:64)	99	47	5,75 (1:54)
Gesamt	237	-	100	137	-

Intracutantest zum Nachweis einer ORF-Immunität

Durch intracutane Applikation von ORF-Virusantigen sollte eine zelluläre Reaktion der Haut als Antwort auf die Immunisierung mit der ORF-Komponente in der Kombinationsvaccine nachgewiesen werden. Eine Hautreaktion vom verzögerten Typ (delayed type hypersensitivity, DTH) wird als zelluläre Immunantwort auf das Parapoxvirusantigen gedeutet und dient gleichzeitig als Nachweis einer gruppenspezifischen Reaktion gegen die Stomatitis papulosa (16).

Bei allen mit Parapoxvirus sensibilisierten Jungrindern konnte zu den angegebenen Kontrollzeiten keine Hautreaktion im Sinne der vorgegebenen klinischen Parameter festgestellt werden (siehe 3.1.4.2.). Eine zelluläre Reaktion auf das ORF-Virusantigen konnte nach der Primovaccination zu diesem Zeitpunkt und unter diesen Testbedingungen noch nicht nachgewiesen werden.

Die Betriebssituation, aufgegliedert in Morbidität und Mortalität, in den 8 Versuchsbetrieben vor und nach dem Impfversuch ist in Tabelle 6 zusammengestellt. Daraus ist deutlich ersichtlich, daß der Impferfolg in den einzelnen Beständen sehr stark von der Betriebssituation abhing. Obwohl in einzelnen Betrieben, z.B. K.F., L.A., keine echte Verbesserung der Morbiditätsraten nach der Impfung beobachtet werden konnte, kann im ganzen gesehen die Wirksamkeit der Vaccine doch positiv bewertet werden. Hierfür sprechen vor allem die Ergebnisse in den BVD/MD "Problembeständen". In diesen Betrieben (G.E., H.F., S.J.) traten nach der Impfung keine oder nur noch einzelne Erkrankungen auf. Für eine Nutzen-Kosten-Analyse ist außerdem von Bedeutung, daß in keinem der Impfbestände nach der Impfung Todesfälle beobachtet wurden.

In der Tabelle 7 sind die entsprechenden Daten der 2 Betriebe, die bereits vor Beginn unserer Feldversuche gegen BVD/MD impfen ließen, gesondert dargestellt. Auch hier konnten die Verluste durch den Einsatz der BVD/ORF deutlich gesenkt werden. Besonders signifikant war dieser Effekt im Bestand K.L., in dem bei der letzten Belegung vor der Impfung von 35 Kälbern 30 erkrankten und 10 starben. Von den geimpften 52 Tieren erkrankten nur noch 4. Todesfälle traten nicht auf. Im Durchschnitt verringerte sich nach der Impfung mit der Kombinationsvaccine die Morbidität (hauptsächlich respiratorische Erkrankungen) unter den Mastkälbern von 40 % auf 19 %, wobei es sich hauptsächlich um respiratorische Erkrankungen handelte. Tierverluste waren keine mehr zu beklagen.

3.2.3. Nachweis der paraspezifischen Wirkung

3.2.3.1. VSV-Infektionsmodell

Bei den mit virusfreien Zellkulturmedium vorbehandelten Babymäusen der Kontrollgruppe trat nach der Belastung mit dem Stomatitis Vesicularis Virus (VSV) eine Mortalität von 100 % auf. Entsprechend ließ sich nach Vorbehandlung mit der Kombinationsvaccine BVD/ORF bei einer sehr geringen Mortalität von 6 % während des Auswertungszeitraums nach der VSV-Belastung ein Schutzindex von 94 errechnen (siehe Tab. 8). Entsprechend der Erfahrung aus früheren VSV-Versuchen konnte die Parapox-Viruskomponente (ORF) der Vaccine den höchsten Schutzindex erzielen (75). Die Vorbehandlung der Babymäuse sowohl mit der BVD/MD-Komponente der Kombinationsvaccine als auch mit einer handelsüblichen BVD/MD-Vaccine bewirkte keinen unspezifischen Schutz gegen die VSV-Belastung. Die Mortalität bei jeder dieser beiden Versuchsgruppen entsprach der Kontrollgruppe (Tab. 8).

Betrieb u. Aufstallungsprophylaxe:	vor der Impfung					nach der Impfung		
	Betriebs- problematik	Zahl der aufge- stallten Tiere	Morbi- di- tät	Morti- li- tät	Zahl der aufgestallten Tiere	Morbi- di- tät	Morti- li- tät	
I = Rindergrüpe-Impfung II = IBR-Impfung III = Einsatz von Antibiotika im Futter IV = Einsatz von Inducern (BSK, Kolb)								
G.E.; I, II (+ BVD/MD-Impfung)	alter Stall schl. Lüftung BVD/MD	60	25	10	37	0	0	
H.F.; I, II, III,	dichte Belegung, hoher Infektions- druck; BVD/MD	100	78	25	39	4	0	
K.F.; II, III	--	90	7	1	25	15	0	
K.A.; III,	--	30	5	1	20	0	0	
L.A.; I, III,	--	30	5	1	20	6	0	
K.L.; III, (+BVD/MD-Vacc.)	mangelnde Hygiene	105	25	9	52	4	0	
S.J.; III,	neg. Tierbetr. BVD/MD	30	30	28	30	2	0	
V.P.; III, IV	alter Stall schlechte Lüftung	38	16	5	14	14	0	
Summe	--	483	191	80	237	45	0	
Summe in %	--	100	40,0	17,0	100	19	0	

Tabelle 7

Betriebssituation nach der letzten Aufstallung vor Beginn und nach dem Feldversuch mit der BVD/ORF Vaccine in 2 Betrieben, die regelmäßig mit einer handelsüblichen BVD-Vaccine impfen ließen.

Tierbestand	Zahl der Impfinge	Art des Impfstoffes	Morbidity		Mortality
			resp. Erkrank.	Kümmerer	
G.E.	25	BVD-MD Pneumovacc plus ^R (Impf- stoff gegen PI-3, BVD-MD, IBR)	1	0	1
	18	Versuchs- vaccine BVD/ORF	0	0	0
K.L.	35	BVD/MD-Vacc., unbekanntes Handelspräp.	30	10	6
	52	Versuchs- vaccine BVD/ORF	4	0	0

Tabelle 8

Nachweis der paraspezifischen Wirkung der
BVD/ORF-Vaccine im VSV-Test

Testpräparat	Mortalität	Wirkungsindex
BVD/ORF-Vaccine	6	94
BVD-Komponente der Versuchsvaccine	100	0
BVD-Vaccine (Vernie, Handelsimpfstoff)	100	0
ORF-Komponente der Versuchsvaccine	3	97
Placebo: virusfreies Zell- kulturmedium	100	0

3.2.3.2. Aujeszky-Infektionsmodell

Die Mortalität unter adulten, mit virusfreiem Zellkulturmedium vorbehandelten und anschließend mit Aujeszky-Virus belasteten Mäusen betrug 90 %. Nach der Vorbehandlung mit der BVD/ORF-Kombinationsvaccine verringerte sich die Mortalität bei gleicher Mäusezahl auf 33 %. Noch weiter gesenkt werden (auf 27 %) konnte sie nach Vorbehandlung mit der ORF-Viruskomponente. Die entsprechenden Schutzindizes waren 63 für die Kombinationsvaccine und 70 für die Parapox-Komponente (siehe Tab. 9). Die Vorbehandlung adulter Mäuse mit BVD-Virus (Vaccine, Fa. Vermie) und der BVD/MD-Komponente der Kombinationsvaccine konnte die Mortalität nach der Aujeszkyvirus-Belastung im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht nennenswert senken. Sie betrug 85 % für die mit handelsüblicher BVD-Vaccine behandelten Mäuse und 79 % für die mit dem BVD-Anteil aus der Kombinationsvaccine behandelten Mäuse (Tab. 9).

Tabelle 9

Nachweis der paraspezifischen Wirkung
der BVD/ORF-Vaccine im Aujeszky-Test

Testpräparat	Mortalität (%)	Wirkungsindex
BVD/ORF-Vaccine	33	63
BVD-Komponente der Versuchsvaccine	79	12
BVD-Vaccine (Vernie, Handelsimpfstoff)	85	5
ORF-Komponente der Versuchsvaccine	27	70
Placebo: virusfreies Zell- kulturmedium	90	0

4. Besprechung der Ergebnisse

Die Gefahren, die in Zusammenhang mit dem Einsatz von BVD-Lebendimpfstoffen diskutiert werden, stellen die Aufgabe, neue Wege zur Verbesserung dieser Impfstoffe zu gehen. Der beste Ausweg wäre ein gut wirksamer Impfstoff aus inaktiviertem BVD-Virus. Diese Alternative ist leider noch nicht befriedigend gelöst worden. Es ist also zunächst nötig, die Unschädlichkeit bekannter, gut wirksamer Lebendimpfstoffe zu verbessern (17, 40).

Es kann einerseits versucht werden vermehrungsfähige BVD/MD-Impfstämme zu modifizieren oder neu zu etablieren mit dem Ziel der vollkommenen Unschädlichkeit bei gleich guter Wirksamkeit im Vergleich zu etablierten Impfstämmen (40). Andererseits bietet sich an, vermehrungsfähige, gut immunisierende Impfstämme durch geeignete Zusätze für den Impfling ungefährlicher zu machen. An erster Stelle steht hierbei die Eliminierung der immunsuppressiven Eigenschaften des BVD/MD-Virus.

Als Möglichkeit zur Verhinderung einer immunsuppressiven Wirkung des BVD-Virus (auch attenuierter Impfvirusstämme) wurde die Kombination des BVD/MD Impfstammes Oregon C24 V mit dem attenuierten ORF Impfvirusstamm D 1701 im Feldversuch erprobt. Diese Kombination darf, besonders was ihre Unschädlichkeit betrifft, als erfolgreich und bezüglich der Stimulation einer Antikörperbildung den BVD/MD-Einfachvaccinen als überlegen bezeichnet werden.

Die Unschädlichkeit der kombinierten BVD/ORF Vaccine wurde an kleinen Labortieren an 2 Versuchs-Schafen sowie 2 Kälbern unter kontrollierten Labor-Bedingungen sowie an 237 Mastrindern unter Feldbedingungen nachgewiesen. Aus den klinischen Beobachtungen und stichprobeweise durchgeführten Leukozytenzählungen waren keine Anzeichen einer eventuellen immunsuppressiven Wirkung des Impfstoffes zu erkennen. Selbst die dreifache Dosis der Kombinationsvaccine wurde von zwei serologisch negativen Kälbern ohne Nebenwirkungen vertragen. Insgesamt wurde für Maus, adult und neugeboren, Kaninchen und Rind eine sehr gute Verträglichkeit nachgewiesen.

Der Nachweis der Wirksamkeit der Vaccine wurde durch Antikörper-Untersuchungen bei immunisierten Kaninchen (Tabelle 2) sowie bei allen immunisierten Rindern erfolgreich geführt. (Tabelle 4).

Die 4 geimpften Kaninchen zeigten eine für dieses Versuchstier sehr gute Antikörperbildung schon nach einmaliger Impfstoffinjection. Bei einem länger zurückliegenden Impfversuch mit Kaninchen und dem nicht kombinierten BVD/MD-Virus Stamm Oregon C24 V hatte kein Tier nach der Primovaccination Antikörper gebildet (34).

Besonders auffällig war, daß bei allen Mastkälbern, die vor der Impfung keine Antikörper aufwiesen, 3 Wochen nach der Impfung im Mittel hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern nachweisbar waren.

Gleiches war bei den Rindern mit niederen prävaccinalen Antikörper-Titer feststellbar. Unter den vor der Impfung als seronegativ eingestuften Tieren (Gruppe I) trat kein sogenannter "Impfversager" auf, bei den Tieren der Gruppe II (niedere Titer) reagierte lediglich ein Kalb nicht mit vermehrter Antikörperbildung nach der Impfung. Rinder mit höheren prävaccinalen Antikörpertitern (Gruppe III) wiesen im Mittel einen leicht abgefallenen Titer im Serum (1:54) 3 Wochen post vaccinationem auf. Dies ist mit einer geringgradigen Impfvirus-Neutralisierung durch die bereits vorhandenen BVD/MD-Antikörper nach Feldvirus-Infektionen erklärbar (4, 61).

Die Serokonversion und der Titerverlauf zweier im Isolierstall gehaltener Mastkälber nach der Impfung mit der dreifachen Antigenmenge beweist, daß eine Steigerung der Antigenmenge beim Kalb keine stärkere Antikörpersynthese induziert, und somit für die Dosierung der Kombinationsvaccine in den Feldversuchen eine optimale Antigenmenge gewählt worden war (s.Tab. 3).

Die bei der Maus nachgewiesene paraspezifische Wirksamkeit der Kombinationsvaccine war eindeutig auf die Parapox (ORF)-Komponente zurückzuführen. Die Tatsache, daß die kommerziell erhältliche BVD/MD-Einfachvaccine aus einem vermehrungsfähigen Impfstamm keinerlei unspezifische Schutzwirkung in den beiden Mäusemodellen induziert hat, zeigt neuerlich, daß BVD/MD-Virus primär keinen stimulierenden Effekt auf die unspezifische Abwehr ausübt. Vielmehr muß, wie beim Rind vielfach nachgewiesen, davon ausgegangen werden, daß diese Virusart initial immunsuppressiv wirkt (29, 37, 67, 83). Durch Kombination mit dem ORF-Virus konnte dieser Effekt bei der Maus aufgehoben werden. Beim Rind zeigte sich der Einfluß der Parapox-Komponente in der Kombinationsvaccine an der ausgezeichneten Immunitätsentwicklung gegen das BVD/MD-Virus. Eine Serokonversion war insbesondere bei den prävacinal seronegativen Kälbern zu 100 % und in Form hoher Titer an neutralisierenden Antikörpern nachweisbar (16).

Rechtzeitige (post partum) und zum Schutz ausreichende eigene Antikörperbildung gegen BVD/MD-Viren ist für Kälber unter den heutigen Aufzuchtbedingungen äußerst wichtig. Dabei gilt es zu erwähnen, daß sich neuerdings Berichte häufen, die intrauterine Infektionen mit nicht zytopathogenen BVD/MD-Viren als Ausgangsstadium für die Entwicklung der Mucosal Disease beschreiben (11, 12, 59).

Einmal derart infizierte Kälber können als persistent virämisch zur Welt kommen, und können, falls sie nicht zur Antikörperbildung stimuliert werden, jederzeit mit (zytopathogenen) BVD/MD-Virus superinfiziert werden. Dies führt i.d.R. zu fatalen Ausbrüchen von BVD/MD (11, 12).

Vergleichbar mit derartigen Superinfektionen mit BVD/MD-Feldvirus, sollen auch Impfungen augenscheinlich gesunder Rinder mit derzeit üblichen Lebendimpfstoffen (zytopathogene Impfvirusstämme) tödliche Erkrankungen ausgelöst haben (12, 59).

Das Ausbleiben einer spezifischen zellulären Immunantwort auf das Parapox-Antigen im Sinne einer Hautreaktion vom verzögerten Typ (DTH = delayed type hypersensitivity) dürfte im Wesentlichen auf das Alter der Testtiere und die nur einmalige Impfstoff-Applikation zurückzuführen sein. Bei früheren ähnlichen Versuchen zum Nachweis der zellvermittelten Immunität des Rindes mit homologem und heterologem Parapoxvirus betrug das Mindestalter der Tiere fünf Monate und die Vorsensibilisierung wurde zweimal im Abstand von 3 1/2 Monaten mit heterologem ORF-Antigen durchgeführt (16).

Die Impfung mit der Kombinationsvaccine zeigte deutlich auch eine günstige Auswirkung auf die allgemeine gesundheitliche Situation in den Versuchsbetrieben. So war die Morbidität unter den Versuchstieren erheblich gesenkt und Todesfälle traten nicht mehr auf.

Während wie aus der Anamnese hervorgeht, in einzelnen Betrieben trotz der von allen Besitzern verwendeten Prophylaxe mit "Medizinalfutter", erhebliche Verluste auftraten, beschränkten sich die gesundheitlichen Probleme bei den neu eingestellten Impflingen auf eine geringe Zahl von Kälbern mit respiratorischen Symptomen. Dies trifft insbesondere auch für die beiden Betriebe zu, die bereits vor Versuchsbeginn gegen BVD-MD impfen ließen (Tab. 7). Symptome der BVD-MD oder der Stomatitis papulosa konnten während und nach der Versuchsdauer bei keinem Tier beobachtet werden.

Der hier eingesetzte Kombinations-Impfstoff darf als Novum in zweierlei Hinsicht betrachtet werden:

Es wurde erstmalig ein bekannt immunsuppressiv wirkendes Virus (BVD/MD) mit einem stark paramunisierenden, d.h. die unspezifische Abwehr stimulierenden, Virus (Parapox, ORF) in Form vermehrungsfähiger, attenuierter Impfstämme in direkter Mischung kombiniert.

Diese Kombination hatte für keine der beiden Virusarten negative Folgen, d.h. einerseits bleiben die immunogenen Eigenschaften des BVD-MD-Stammes "Oregon C24V" voll erhalten, und andererseits ist die Parapoxvirus ovis-Komponente (Stamm D 1701) als Paramunitätsinducer wirksam (Tab. 8, 9).

Die zweite Neuerung bei dieser Vaccine ist die Möglichkeit der gleichzeitigen Immunisierung gegen BVD-MD und die Stomatitis papulosa bei zwei- und mehrmaliger Impfung.

Die heterologe Schutzimpfung gegen Stomatitis papulosa mit dem ORF-Virus wurde bereits früher beschrieben (16). Nach dem einmaligen Einsatz der BVD/ORF-Kombinationsvaccine dürfte wegen eines relativ geringen Antigengehalts an ORF-Virus in der Mischung und der Tatsache, daß es sich um eine heterologe Impfung handelt, noch keine voll belastbare Immunität gegen die Stomatitis papulosa aufgebaut worden sein. Nach einer Boosterimpfung jedoch -und diese wird zur BVD-MD Grundimmunisierung bei Kälbern allgemein gefordert- kommt es zur nachweisbaren, hauptsächlich zellulär verankerten Immunität gegen die Stomatitis papulosa. Dies kann in Zukunft von Bedeutung sein, da diese Schleimhauterkrankung weltweit zunimmt, und sehr häufig im Zusammenhang mit klinisch manifester BVD-MD diagnostiziert wird (10, 16).

Mit der hier geprüften neuen Kombinationsvaccine können kurzfristig wirksame Abwehrmechanismen wie Interferon-Ausschüttung und Synthese löslicher Mediatoren (Lymphokine u.a.) angeregt werden, so daß generell eine sichere und intensive Auseinandersetzung mit einem simultan inoculierten Antigen (BVD-Virus) stattfindet (75). Eine Impfvirus-Vermehrung in lymphoreticulären Zellen wird dadurch verhindert, und ein abwehr-schädigender Effekt des BVD-MD Virus unterbunden wird. Dieser Vorteil und die Möglichkeit einer Bekämpfung der Stomatitis papulosa begünstigen die neue Kombinationsvaccine verglichen mit herkömmlichen BVD-MD Impfstoffen.

Zusammenfassung

Wirksamkeit und Unschädlichkeit eines neuen Kombinationsimpfstoffes aus Mucosal Disease- und Ekthymavirus

In 8 Mastbetrieben wurde eine neu entwickelte, kombinierte BVD/ORF Vaccine an insgesamt 237 Kälbern auf Unschädlichkeit und Wirksamkeit geprüft. Die Unschädlichkeit der Vaccine konnte außerdem an Mäusen und Kaninchen und bei Kälbern sowohl unter Labor- als auch Feldbedingungen nachgewiesen werden.

Laboruntersuchungen ergaben eine starke Anti-BVD Antikörperbildung bei Kaninchen und die Induktion einer hohen unspezifischen Abwehrleistung gegenüber heterologer Virusbelastung bei Mäusen.

Zwei unter isolierten Bedingungen gehaltene BVD-seronegative Kälber zeigten hohe Titer an BVD-Virus neutralisierenden Antikörpern 3 Wochen nach einer einmaligen Impfung mit der dreifachen Impfdosis. Eine Leukopenie konnte bei 13 ausgewählten BVD-seronegativen Kälbern an den Tagen 1, 2 und 4 nach der Impfung nicht festgestellt werden.

Bei den Feldversuchen entwickelten alle 69 BVD-seronegativen Kälber hohe Titer an BVD-Virus neutralisierenden Antikörpern 3 Wochen nach einmaliger intramuskulärer Gabe der Vaccine. Ähnliches konnte bei Kälbern mit vor der Impfung niederen BVD-Virus-neutralisierenden Antikörpern beobachtet werden, wogegen die dritte Gruppe der Kälber mit hohen Antikörper-Titern vor der Impfung mit einem leichten Abfall zirkulierender, neutralisierender Antikörper in den 3 Wochen nach der Impfung reagierte.

Eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ (DTH) war bei 3 - 4 Wochen alten Kälbern nach einem Hauttest mit Parapox-Virus nach dieser einmaligen Immunisierung nicht nachweisbar.

Die Morbiditätsrate in den Mastbetrieben war während der gesamten Versuchsdauer deutlich gesenkt. Todesfälle traten bei den geimpften Tieren nicht auf.

Summary

Safety and Efficacy of a New Combined Vaccine of Mucosal Disease- and Contagious Ecthymavirus

In meat producing farms a newly developed combined Parapox/BVD vaccine was tested with a total number of 237 calves regarding safety and efficacy. The safety of the vaccine was proven in mice and rabbits and in calves under laboratory and field conditions.

Laboratory investigations resulted in a strong BVD-antibody response in rabbits and the induction of high unspecific defense against heterologous viral challenge in mice.

Two BVD-seronegative calves kept under isolated conditions showed high titers of BVD-neutralizing antibodies three weeks after a single vaccination with a threefold vaccine dosis. Leukopenia could not be detected in 13 randomly chosen BVD-seronegative calves on days 1, 2 and 4 after vaccination.

In field trials, each of the 69 (29 %) BVD-seronegative calves developed high titers of BVD-neutralizing antibodies three weeks after a single i.m. inoculation of the vaccine. The same phenomenon occurred with animals which had low pre-vaccination BVD-neutralizing antibodies prior to vaccination, whereas the third group of calves with high pre-vaccinational antibody titers had a slight decrease of neutralizing antibodies within three weeks after the vaccination.

A delayed type of hypersensitivity (DTH) reaction in 3-4 week old calves, skin-tested with Parapoxvirus, could not be observed after this single vaccination.

Mortality and morbidity rates in the meat producing farms decreased markedly after the experiment.

L I T E R A T U R N A C H W E I S :

- 1) Ackermann, O., Mode of action of combined vaccines for infectious
and B. Schneider diseases in dogs. In Immunobiological Standardization
1967: 18. International Symposium on combined vaccines, edited
 by R.H. Regamey et al., S. Karger-Verlag, Basel, New York,
 81 - 85.
- 2) Acres, S.P. and Studies on rotaviral antibody in bovine serum lacteal
L.A. Babuik secretions using radioimmunoassay.
1978: J. Amer. vet.med.Ass. 173, 555-559.
- 3) Ast, D., Association of inactivated measles vaccine to DPT Vaccine;
R. Dubrenil, Antigenicity in Guinea Pigs.
V. Pavilanis and Symp. Series immunobiol. Standard. 7, 73-80.
M. Guevillon, 1967:
1967:
- 4) Bachmann, P.A., Bekämpfung von BVD/MD-Virusinfektionen.
1985: Pro Veterinario 2, 6.
- 5) Bachmann, P.A., Vaccination of cows with K 99 and Rotavirus antigen:
G., Baljer, Potency of K 99 antigen combined with different adjuvants
X., Gmelch, in stimulating milk antibody secretion.
W., Eichhorn, Zbl. Vet. Med. B, 31, 660-668.
P., Plank and 1984:
A., Mayr, 1984:
- 6) Baczynski, Z., Further investigations on the incidence of enzootic
1978: virus infections of the respiratory and digestive
 systems of cattle in large breeding farms.
 Bull.vet. Inst. Pulawy, 22, 14 - 17.
- 7) Becker, W., Antikörperverlaufskontrollen nach zwei- und dreimaliger
H.-J., Bengelsdorff Impfung mit Bovigrip ad. us. Vet.
and O., Jaeger, Blauen Hefte. 65, 221 - 227.
1982: 1982:

- 8) Benary, F.,
1975: Untersuchungen über die Antikörperbildung bei Hunden nach der Impfung mit einer Reo-Influenza A2/Hongkong-Kombinationsvaccine.
Vet.med.Diss., München.
- 9) Bittner, J.,
1963: Experimental prophylaxis of gas gangrene with monovalent and polyvalent toxoids.
Bull. off. int. Epizoot. 59, 1005 - 1016.
- 10) Bohac, J.G., and
W.D.G. Yates,
1980: Concurrent Bovine Virus Diarrhea and Bovine Papular Stomatitis Infection in a Calf.
Can. vet. J. 21, 310 - 313.
- 11) Bolin, S.R.,
A.W. Mc Clurkin,
R.C. Cutlip and
M.F. Coria,
1980: Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhea virus.
Am.J.Vet.Res. 46, 573 - 576.
- 12) Brownlie, J.,
M.C. Clarke and
C.J. Howard,
1985: Aetiology and pathogenesis of mucosal disease: current concepts, observations and speculation.
Australian Vet.J. 62, 142 - 143.
- 13) Brunner, R.,
1983: Neue Versuchstiermodelle zum Nachweis einer medikamentellen Stimulierung der unspezifischen körpereigenen Abwehr.
Vortrag auf dem XXII. Welttierärztekongreß in Perth, Australien.
- 14) Bundesgesetzblatt, Jahrgang 1972, Teil I, Seite 927: "Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes".
- 15) Buschmann, H.G.,
1983: Neue Entwicklungen in der Immunologie und deren Auswirkungen auf die Tiermedizin.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 96, 127 - 131.

- 16) Büttner, M.,
1980: Heterologe Schutzimpfung gegen die Stomatitis
Papulosa mit einem ORF-Lebendimpfstoff.
Vet.Med. Diss., München.
- 17) Büttner, M.,
1984: Verbesserung der Wirksamkeit und Unschädlichkeit von
BVD-MD Vaccinen durch Zusätze zur Steigerung der
unspezifischen Abwehr. XIII.th World Congress on
Diseases of cattle. Proceedings Vol.I. Durban,
South Africa.
- 18) Castrucci, G.,
G. Avellini,
V. Cilli,
B. Pedini,
D.G. Mc Kercher
and C. Valente,
1975: A study of immunologic relationship among serologically
heterologous strains of bovine viral diarrhea virus by
cross immunity tests.
Cornell Vet. 65, 65 - 72.
- 19) Chen, K.S.,
D.W. Johnson and
C.C. Muscoplat,
1985: Adjuvant enhancement of humoral immune response to
chemically inactivated bovine viral diarrhea virus.
Can.J. Comp.Med. 49, 91 - 94.
- 20) Chennekatu, P.P.,
D.E. Tyler and
F.K. Ramsey,
1967: Characteristics of a condition following vaccination
with bovine diarrhea vaccine.
J.Am.Vet.Med.Assoc. 150, 46 - 52.
- 21) Coggings, L.,
1964: Standardization of Virus-Neutralization Test for
Bovine Virus Diarrhea.
Am J. Vet. Res. 25, 103 - 107.

- 22) Coulehan, J.L.,
C. Hallovell,
R.H. Michels,
T.K. Velty,
N. Lui and
J.S.C. Kuo,
1983:
Immunogenicity of a Haemophilus influenza Type b
Vaccine in Combination with Diphtheria-Pertussis-Tetanus
Vaccine in Infants
J.Inf.Dis. 148, 530 - 534.
- 23) Eissner, G.,
1967:
Combined antigens for veterinary use. In: Immunobiological
Standardization, 13. International Symposium on Combined
Vaccines, edited by R.H. Regamey et. al., S. Karger-Verlag,
Basel, New York, 45 - 48.
- 24) Hamdy, A.H.,
N.B. King and
A.L. Trapp,
1964:
Immunisation of cattle against shipping fever
Am. J.Vet. Res. 25, 1648 - 1652.
- 25) Hoechst
Veterinär GmbH,
1985:
Kerninformationen über eine neue Aujeszky-Schweineinfluenz.
Kombinationsvaccine. (Arraflu)
- 26) Jaeger, O. and
R. Barth,
1972:
Tierexperimentelle Erfahrungen mit einem
Prevacun^R-Tetanus-Kombinationsimpfstoff
Blaue Hefte 48, 381 - 386.
- 27) Jerne, N.K.,
1967:
The problem of antigen competition.
In: Immunobiological Standardization
13. International Symposium on Combined Vaccines, edited by
R.H. Regamey et. al., S. Karger-Verlag, Basel,
New York, 1 - 6.
- 28) Jerne, N.K.,
1974:
Towards a network theory of the immune system.
Ann. Immunol. Inst. Pasteur 125 C, 373 - 389.

- 29) Johnson, D.W. and C.C. Muscoplat,
1973: Immunologic Abnormalities in Calves with Chronic Bovine Viral Diarrhea.
Am. J. Vet. Res. 34, 1139 - 1141.
- 30) Kärber, G.,
1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 162, 480.
- 31) Kahn, D.E., J.B. Emery,
M.J. Smith and A.M. Sports
1983: Safety and efficacy of Modified-Live Canine Parvovirus vaccine.
Veterinary Medicine & Small Animal Clinician.
78, 1739 - 1743.
- 32) Kahrs, R.F.,
1973: Effects of bovine viral diarrhea on the developing fetus. J.Amer.Vet.Med.Ass. 163, 877.
- 33) Kerry, O., R.J. Noelle,
J.W. Uhr and P.H. Krammer,
1985: B cell growth factor (B-cell growth factor 1 or B-cell-stimulating factor, provisional 1) is a differentiation factor for resting B cells and may not induce cell growth.
Proc.Natl.Acad.Sci. 82, 2465 - 2467.
- 34) Kießling, U.,
1972: Vergleichende Untersuchungen über die Antikörperbildung bei Kaninchen, Meerschweinchen und Huhn nach der Impfung mit attenuierten und inaktivierten Virusstämmen der Parainfluenza-3 und der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal-Disease. Med.Vet.Diss., München.

- 35) Kolar, J.R.,
I.L. Shechmeister
and L.E. Strack,
1972: Use in cattle of formalin killed polyvalent vaccine with
adjuvant against infectious bovine rhino-tracheitis, bovine
viral diarrhea and parainfluenza 3 viruses
Am.J. Vet. Res. 33, 1415.
- 36) Krakovka, S.,
R.G. Olsen,
Axthelm, et al,
1982: Canine parovirus infection potentiates canine distemper
encephalitis attributable to modified live-virus vaccine
J. Am. Vet. Med. Assoc. 180, 137 - 139.
- 37) Lambert, G.,
1973: Bovine Viral diarrhea: Prophylaxis and postvaccinal reactions
J.Amer.Vet.Med.Ass. 163, 874 - 876.
- 38) Liebermann, H.,
1967: Das Infektionsspektrum des Virus der Stomatitis Papulosa.
Arch.exp.vet.Med. 21, 1337.
- 39) Liess, B.,
S. Orban,
H.-R. Frey,
G. Trautwein,
W. Wiesel and
H. Blindow,
1984: Studies on transplacental transmissibility of a Bovine
Virus Diarrhoe (BVD) vaccine virus in cattle.
Zbl. Vet. Med. B. 31, 669 - 681.
- 40) Lobmann, M.,
P. Charlier,
G. Forent and
N. Zygraich,
1984: Clinical evaluation of a temperature-sensitive bovine viral
diarrhea vaccine strain.
Am. J. Vet. Res. 45, 2498 - 2502.
- 41) Lopez, A.,
M.G. Maxie,
M. Savan,
H.L. Ruhnke,
R.G. Thompson,
D.A. Barnum and
H.D. Geissinger,
1982: The Pulmonary Clearance of Pasteurella haemolytica in
Calves Infected with bovine Virus Diarrhea or Mycoplasma
bovis.
Can. J. Comp. Med. 46, 302 - 306.

- 42) Mann, D.D., Efficacy of aerosol, intranasal and intramuscular vaccination
G.M. Buening and against selected Bovine Viral Disease.
J.G. Thorne, Cornell Vet. 73, 375 - 379.
1983:
- 43) Martin, S.W., Vaccination: Is it Effective in Preventing Respiratory Disease
1983: or Influencing weight Gains in Feedlot Calves?
Can. Vet. J. 24, 10 - 19.
- 44) Martin, S.W., A Field Trial, of Preshipment Vaccination, with Intranasal
1983: Infectious Bovine Rhinotracheitis-Parainfluenza-3 Vaccines.
Can. J. Comp. Med. 47, 245 - 249.
- 45) Mayr, A., Entwicklung neuer Immunisierungs- und Paramunisierungs-
1979: Verfahren in der Tiermedizin
Die blauen Hefte für den Tierarzt, 501 - 502.
- 46) Mayr, A., Induction of Paramunity. In: Biological Products for Viral
1981: Diseases ed. P.A. Bachmann
Munich Symposium Microbiol., Taylor & Francis Verlag,
201 - 227.
- 47) Mayr, A., Aktive Schutzimpfung mit heterologen Impfstoffen.
G. Baljer and Tierärztliche Umschau. 35, 560 - 576.
M. Büttner,
1980:
- 48) Mayr-Bibrack, B., Impfkalender.
1984: Upjohn GmbH.

- 49) Mayr-Bibrack, B.,
1982: Neue Bekämpfungsverfahren gegen Virusinfektionen des Hundes: Kombinationsvaccine gegen den Zwingerhusten und Paramunisierung gegen das infektiöse Welpensterben. Praktische Tierarzt. 63, 11 - 18.
- 50) Mayr, A. and
M. Büttner,
1984: Wesen, Bedeutung und Bekämpfung des Infektiösen Hospitalismus in der Tierproduktion. XIII th World Congress on Disease of cattle. Durban, South Africa, 1, 371 - 379.
- 51) Mayr, A. and
M. Büttner,
1984: Neue Erkenntnisse über die Grundlagen der Paramunität und Paramunisierung. Berl.Münch.Tierärztl. Wschr. 97, 429 - 435.
- 52) Mayr, A. and
M. Büttner,
1985: Bovine Papular Stomatitis (BPS) in: "Viruses of the Ruminants" .
edt.by Z. Dinter, Elsevier-Verlag, Amsterdam, in press.
- 53) Mayr, A.,
G. Eißner and
B. Mayr-Bibrack,
1984: "Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin". Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 488 - 503.
- 54) Mayr, A.,
B. Mayr-Bibrack,
P. Thein and
G. Witzigmann,
1979: Funktionell synergistische Kombinationsvaccinen. Ein neuer Impfstofftyp. Zbl. Vet. Med. B, 26, 222 - 238.

- 55) Mayr, A.,
J. Ringseisen,
G. Baljer,
B. Bibrack,
J. Wallner and
H. Zimmer,
1969: Untersuchungen über Art, Umfang und Ursachen von Impfschäden nach der Maul- und Klauenseuche-Schutzimpfung in Bayern in den Jahren 1967/68.
Zbl. Vet. Med. B, 16, 487 - 511.
- 56) Mayr, A.,
P.A. Bachmann,
B. Bibrack and
G. Wittmann,
1974: Virologische Arbeitsmethoden, Band I, 69 - 73.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- 57) Mayr, A.,
Ch. Raettig,
H. Stickl and
M. Alexander,
1979: Paramunität, Paramunisierung, Paramunitätsinducer Teil I und II Fortschr. Med. 97, 1159, 1205.
- 58) Mayr, A.,
G. Wizigmann,
H. Schels and
P. Plank,
1969: Entwicklung und Erprobung eines Kombinations-Impfstoffes gegen die Parainfluenza-3, Mucosal Disease- und Pasteurella haemolytica-Infektion des Rindes.
Zbl.Vet.Med. B, 16, 454 - 579.
- 59) Mc Clurkin,
A.W., S.R. Bolin
and M.F. Coria,
1985: Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea.
J.Amer.Vet.Med.Ass. 186, 568 - 569.
- 60) Mc Kercher, D.G.,
J.K. Saito,
G.L. Crenshaw and
R.B. Bushnell,
1968: Complications in cattle following vaccination with a combined bovine viral diarrhoea-infectious bovine rhinotracheitis vaccine.
J.Amer.Vet.Med.Ass. 152, 1621 - 1625.

- 61) Menauteaú, A.M., Effect of maternal antibody upon vaccination with
T.R. Ames, infections bovine rhinotracheitis and bovine virus
D.W. Johnson and diarrhea vaccines.
J.C. Meiske, Can.J. Comp.Med. 49, 10 - 14.
1985:
- 62) Mengeling, W.L., Immunogenicity of bivalent vaccine for reproductive
D.E. Gutekunst, failure of swine induced by pseudorabies virus and
E.C. Pirtle and porcine parvovirus.
P.S. Paul, Am.J.Vet.Res. 42, 600 - 604.
1981:
- 63) Meyer, H.M., Response of Volta children to jet inoculation of combined
D.D. Hostetler, live measles, smallpox and yellow fever vaccines.
B.C. Bernheim, Bull. Wld. Hlth. Org. 30, 783 - 794.
N.G. Rogers,
P. Lambin,
A. Chassary,
R. Labusquiere and
J.E. Smadel,
1964:
- 64) Michaelis, L., Weitere Untersuchungen über Eiweißpräzipitine.
1904: Dtsch.med.Wschr. 30, 1240.
- 65) Miller, J., Reciprocal competition of a variety of antigens in the
C. Martinez and suppression of immunologic reactivity.
R.A. Good, J. Immunol. 93, 342 - 351.
1964:

- 66) Moos, M.,
E. Schüler,
B. Zarnack,
1984:
Möglichkeiten eines kombinierten Einsatzes von Paramunitätsinducern und von Impfstoffen bei der Bekämpfung der Atrophischen Rhinitis der Schweine.
Tagung der Fachgruppe Bakteriologie, Schloß Rauischolzhausen bei Marburg, 163 - 173.
- 67) Muscoplat, C.C.,
D.W. Johnson and
J.B. Stevens,
1973:
Abnormalities of in Vitro Lymphocyte Responses During Bovine Viral Diarrhea Virus Infection.
Am. J. Vet. Res., 34, 753 - 755.
- 68) Nedjalkov, S.,
N. Stoilowa and
B. Pytshev,
1973:
Zur Wechselwirkung der Antigene in Mischvaccinen gegen Anaerobierinfektionen der Schafe.
Arch. exp. Vet. Med. 27, 185.
- 69) Orban, S.,
B. Liess,
S.M. Hafez,
H.R. Frey,
H. Blindow and
B. Sasse-Patser,
1983:
Studies on transplacental transmissibility of a Bovine Virus Diarrhea vaccine virus.
Zbl.Vet.Med. B, 30, 619 - 634.
- 70) Paul, W.E.,
1984:
Nomenclature for B-cell Stimulatory Factors.
Cellular Immunology. 84, 461 - 462.
- 71) Peacock, G.V.,
1967:
Combination canine vaccines.
18. International Symposium on Combined Vaccines
Edited by R.H. Regamey, et. al. S. Karger-Verlag,
Basel, New York, 99 - 111.

- 72) Petermann, H.,
1931: Kombinationsvaccinen zur Immunprophylaxe virusbedingter Krankheiten.
Wien.tierärztl.Mschr. 68, 13 - 22.
- 73) Piendl, D.,
1980: Experimentelle Untersuchungen über die Wirksamkeit einer kombinierten Gasbrand-Tetanus-Impfung bei der Maus,
Vet.Med.Diss. München.
- 74) Regamey, R.H.,
W. Hennessen,
D. Ikic and
J. Ungar,
1967: Symposia series in Immunobiological standardization.
Vol. 7, Edited by R.H. Regamey, W. Hennessen, D. Ikic and J. Ungar, International Symposion on combined vaccines
S. Karger-Verlag, Basel, New York, p.p. 264.
- 75) Reubel, G.,
1983: Gewinnung von Mediatoren aus Zellkulturen zur Stimulierung der unspezifischen Infektabwehr (Paramunisierung).
Vet.Med. Diss., München.
- 76) Ritter, J.,
1983: Immunosuppression with combined vaccines.
J.Amer.Vet.Med.Ass. 182, 1160 - 1161.
- 77) Rockborne et al.,
1974: Bovine Viral Diarrhea Virus: Acquired Resistance to Acriflavine as Marker of an Attenuated Strain.
Arch. f. gesam. Virusforschg. 45, 128 - 134.
- 78) Rolle, M. and
A. Mayr,
1984: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre,
ENKE-Verlag 5. neubearbeitete Auflage.
- 79) Salsbury, D.L.,
1984: Control of Respiratory Disease and Border Disease in sheep
experimental use of modified-live-virus intranasal IBR/PI-1
and modified-live-virus Bovine Viral Diarrhea vaccines.
Veterinary Medicine & Small Animal Clinician. 79, 401 - 40

- 80) Schimpl, A.,
1984: Lymphokines Active in B cell Proliferation and Differentiation.
Springer Semin. Immunopathol. 7, 299 - 310.
- 81) Schmidt, G.,
1967: Combined Influenza and Tetanus Antigens
18. International Symposium on Combined Vaccines,
Edited by R.H. Regamey, S. Karger-Verlag, Basel,
New York, 129 - 123.
- 82) Sprino, P.J. and
L.L. Harris,
1983: Serologic interference study of a canine parvovirus, distemper,
hepatitis, parainfluenza L., canicola-icterohaemorrhagiae
vaccine.
Veterinary Medicine & Small Animal Clinician. 78, 337 - 339.
- 83) Steck, F.,
S. Lazary,
H. Fey,
A. Wandeler,
Chr. Huggler,
G. Opplinger,
H. Baumberger,
R. Kaderli and
J. Martig,
1980: Immune Responsiveness in Cattle Fatally Affected by Bovine
Virus Diarrhea-Mucosal Disease.
Zbl.Vet. Med. B, 27, 429 - 445.
- 84) Stöber, M.,
1983: Neue Erkenntnisse über das BVD-Syndrom des Rindes:
Erreger, Immunitätsgeschehen, Verlauf und Verbreitung,
Bekämpfung.
Collegium veterinarium XIV, 88 - 98.
- 85) Terpstra, C.,
J.L. Fikelenboom
and C. Glas,
1984: Experiences with early vaccination of fattening calves
against infectious bovine rhinotracheitis, bovine virus
diarrhea and parainfluenza Type 3.
Proceeding, XIIth world congress on diseases of cattle,
the Netherlands, 1, 177 - 181.

- 86) Thein, P. and A. Mayr,
1981: Neue Möglichkeiten der Hustenbekämpfung beim Pferd, Auswertung eines Feldversuchs mit einem neuen Impfstoff gegen Atemwegsinfektionen beim Pferd (Resequin). Blauen Hefte für den Tierarzt. 63, 124 - 129.
- 87) Tribe, G.W., A.D. Kamarek, I.B. Kerry and G. White,
1969: A combined bovine parainfluenza and adeno virus vaccine Vet. Rec. 84, 229.
- 88) Wagner, C.,
1983: Entwicklung einer numerisch-additiven Kombinationsvaccine gegen Tetanus und Variola. Vet.med.Diss., München.
- 89) Wells, P.W., J.T. Robinson, N.J.L. Gilmour, W. Donachie and J.M. Sharp,
1984: Development of a combined Clostridial and Pasteurella Haemolytica vaccine for sheep. Veterinary Record. 114, 266 - 269.
- 90) Wilson, G.S. and A.A. Miles,
1964: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity 5 th Edition, 2, E. Arnold Ltd., London.
- 91) Wizigmann, G.,
1984: Bekämpfung der JBR-JPV. Pro. Veterinario 2, 7.
- 92) Zygraich, N., P. Charlier, G. Florent, M.A. Gill, W.H. Beckenhauer and R. Bartels,
1985: Langzeituntersuchung zur Immunogenität eines Kombinationsimpfstoffes für Hunde. Kleintierpraxis. 30, 45 - 48.

L e b e n s l a u f

Am 10. Juni 1944 wurde ich als zweiter Sohn des Arztes Dr. Georg Grahamer und seiner Ehefrau Johanna, Cäcilie, geb. Guggemos, in Füssen geboren.

Von 1950 bis 1955 besuchte ich die Volksschulen in Dachau und Füssen.

1955 wechselte ich auf die Oberrealschule Dachau über.

Als Studienseminarist war ich von 1957 bis 1961 an der höheren Schule in Neuburg an der Donau.

Am Ignaz-Taschner-Gymnasium bestand ich 1966 die Reifeprüfung.

Anschließend diente ich als Freiwilliger bei der Deutschen Luftwaffe bis 1968.

Im Sommersemester 1968 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich im Mai 1974 mit der Approbation das Studium beendete.

Von 1974 bis 1979 arbeitete ich als Assistent, bzw. Praxisvertreter in Bayern.

Während dieser Zeit führten mich mehrere Studienreisen für 15 Monate nach Ostafrika.

Am 4. Mai 1979 heiratete ich meine Ehefrau Karola, Johanna, geb. Lehmann.

Am 6. Juni 1979 wurde unsere Tochter Johanna, Karola und am 21.

August 1980 unser Sohn Georg, Meinrad geboren.

Im Februar 1980 ging ich mit dem Tierarzt Dr. Werner Schmidt, Eisolzried, eine Sozietät ein.

Im Sommer 1982 eröffnete ich meine eigene Praxis.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und für seine freundliche Unterstützung danken.

Frau Professor Dr. B. Mayr-Bibrack danke ich für ihre großzügige Unterstützung bei der Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. M. Büttner danke ich für die ständige intensive wissenschaftliche Betreuung und zahlreiche Literaturhinweise.

Frau B. Haas danke ich für ihre Hilfe bei der Bearbeitung des umfangreichen Untersuchungsmaterials.

Fräulein A. Jahr danke ich für ihre Hilfe, die zu jeder Tages- und Nachtzeit diese Arbeit mit der Schreibmaschine ins Reine schrieb.

